N° d'Ordre : 6
Série : E.

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

E. LOBSTEIN

Chef de Travaux pratiques
Chargé du Cours d'Hydrologie et Hygiène
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

1re THÈSE : RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR LE BACILLE TUBERCULEUX.

2me THÈSE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 13 MARS 1923 **devant la Commission d'examen**

M. M. TERROINE, *Président*
DE LAPPARENT, LAGARDE, SARTORY, *Examinateurs*

EDITIONS
de la GAZETTE MÉDICALE DE STRASBOURG
ET REVUE D'HYGIÈNE SOCIALE
26, Avenue de la Marseillaise, 26
Strasbourg
1922

N° d'Ordre : 6
Série : E.

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

E. LOBSTEIN

Chef de Travaux pratiques
Chargé du Cours d'Hydrologie et Hygiène
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

1re THÈSE : RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR LE BACILLE TUBERCULEUX.

2me THÈSE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 13 MARS 1923 **devant la Commission d'examen**

M. M. TERROINE, *Président*
DE LAPPARENT, LAGARDE, SARTORY, *Examinateurs*

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

EDITIONS
de la GAZETTE MÉDICALE DE STRASBOURG
ET REVUE D'HYGIÈNE SOCIALE
26, Avenue de la Marseillaise, 26
Strasbourg
1922

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Doyen ..... P. MULLER ..... Professeur de Chimie générale et de Chimie physique.

Doyen honoraire. E. BATAILLON

Professeurs

A. DENJOY	Mathématiques générales.
G. VALIRON	Calcul différentiel et intégral.
H. VILLAT	Mécanique.
M. FRÉCHET	Analyse supérieure.
E. ESCLANGON ...	Astronomie.
P. WEISS	Physique générale.
H. OLLIVIER	Physique générale.
E. ROTHÉ	Physique du Globe.
L. HACKSPILL	Chimie minérale.
H. GAULT	Chimie organique.
E. TOPSENT	Zoologie et Anatom. comparée
C. HOUARD	Botanique.
E. TERROINE	Physiologie générale.
J. DE LAPPARENT	Pétrographie.
M. GIGNOUX	Géologie et Paléontologie.
E. CHATTON.....	Biologie générale.
E. BAUER.....	Physique mathématique.
E. CORNEC	Chimie appliquée.
H. LABROUSTE ...	Physique du Globe.
G. RIBAUD.....	Physique générale.
F. VLÈS	Physique biologique.

Secrétaire A. RENARD

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. F. TERROINE

Hommage de très vive gratitude
et de profond dévouement.

INTRODUCTION

Depuis la découverte du bacille tuberculeux par Koch en 1882, un nombre considérable de travaux ont été poursuivis et publiés, dans tous les pays, sur ce microorganisme qui, par ses caractères très particuliers, se distingue nettement des autres bactéries. D'ailleurs le fait qu'il est un agent pathogène des plus redoutables explique à juste titre la multiplicité ininterrompue des recherches, mais celles-ci sont naturellement orientées vers le traitement de la maladie qu'il crée plutôt que vers sa biologie propre.

Ce n'est pas que des analyses chimiques n'aient été faites, mais dans un cadre assez limité et le plus souvent en vue de l'isolement des produits toxiques et l'étude des lésions déterminées par eux. Ce n'est pas non plus que des essais de cultures en milieu chimiquement défini n'aient été tentés et avec succès, mais à la vérité l'étude de la nutrition du bacille et de ses fonctions biochimiques a suscité peu de travaux.

Me plaçant donc surtout sur le terrain biologique, j'ai établi des milieux chimiquement définis aussi simples que possible, — sans d'ailleurs qu'aucun d'eux fût nécessairement le milieu optimum —, et j'ai étudié l'utilisation par le bacille tuberculeux de diverses matières azotées, de certains sels organiques et principalement des hydrates de carbone à cause de l'éclectisme très limitatif qu'il paraissait montrer vis-à-vis de ces derniers aliments ; j'ai cherché quelles diastases il est susceptible de sécréter selon les milieux nutritifs qui lui sont offerts, et j'ai étudié aussi la nature des toxines produites.

Il m'a paru surtout intéressant de voir si la composition chimique très spéciale et singulièrement riche en matières grasses du bacille tuberculeux demeurait à peu près constante quelle que fût la constitution du milieu sur lequel on le cultivait, ou bien si elle variait d'importante façon avec la quantité ou la qualité des aliments donnés, en particulier avec un milieu nutritif privé de glycérine. En d'autres termes, à des alimentations identiques par ailleurs mais différant entre elles uniquement par la nature des hydrates de carbone, l'organisme répond-

il par une variation quantitative et qualitative des corps gras qu'il forme ? Cet examen pouvait peut-être apporter une contribution, si minime fût-elle, à l'étude du mécanisme toujours mystérieux de la transformation des hydrates de carbone en graisses.

Enfin, bien qu'accessoirement, il était intéressant aussi de constater si des variations parallèles atteignaient les propriétés histo-chimiques non moins spéciales du bacille, sa résistance aux radiations ultra-violettes, sa morphologie et sa virulence.

Ces recherches étaient poursuivies au Laboratoire du Sanatorium de la Ville de Paris : la guerre puis les bouleversements ultérieurs les interrompirent et retardèrent leur publication. — Ce sont les résultats acquis jusqu'alors que j'ai rassemblés ici, mais enrichis ou précisés par des recherches complémentaires faites d'après les indications et les bienveillants conseils de M. le Professeur TERROINE qui en outre, pendant le temps que je passai à son Institut de Physiologie générale, me fit largement bénéficier de sa grande expérience dans le dosage délicat des corps gras. Ma reconnaissance s'adresse également à M. le Professeur SARTORY qui voulut bien s'intéresser à mon travail et mettre à ma disposition les ressources de son Laboratoire de Bactériologie.

Certes le sujet est trop vaste pour être jamais épuisé et aux divers problèmes d'études ici envisagés il serait illusoire de penser apporter une solution complète et définitive. Au surplus, reprises dans des conditions matérielles moins favorables que naguère, mes expériences se trouvèrent limitées : si grandes en effet que soient la prudence acquise et les précautions prises, de telles manipulations demeurent toujours dangereuses quand elles n'ont pas à leur service une installation spéciale.

L'exposé historique a été accru des recherches publiées pendant la guerre et depuis la fin des hostilités. En parcourant les travaux allemands on demeure étonné de l'oubli que manifeste souvent à l'égard de nos savants leur biblio-

graphie si profuse par ailleurs. Pourtant on ne saurait supposer que les auteurs ignorent les grands noms français marquant toutes les étapes de la microbiologie ou de la physiologie. — Même en croyant doter la médecine d'une lymphe qui guérissait la tuberculose, KOCH n'était pas tout-à-fait aussi inventeur que ses compatriotes se plaisent à le dire : il faisait une très ingénieuse extension et application à cette maladie d'une méthode générale d'immunisation par injections de matières solubles vaccinantes d'origine microbienne. Or cette méthode dans son principe est née en France : son invention date de 1879 et appartient à TOUSSAINT, comme appartient à RAYER et DAVAINE la découverte fondamentale de l'action pathogène de la bactéridie charbonneuse. Et, à un point de vue plus général, si nul ne conteste la valeur des travaux poursuivis par les chercheurs de tous pays dans le domaine de la physiologie et de la microbiologie, néanmoins il n'est pas téméraire de dire qu'ils procèdent tous des idées fécondes et des géniales découvertes de CLAUDE BERNARD et de PASTEUR.

Mon étude est divisée en 5 Chapitres :

Dans le 1er Chapitre, j'étudie la culture du bacille tuberculeux sur milieu chimiquement défini, et ses processus de nutrition.

Le Chapitre II est consacré à la transformation du milieu au cours du développement microbien, et aux produits sécrétés (diastases et toxines).

Le Chapitre III traite de la composion chimique du bacille et des influences qu'ont sur elle la constitution des milieux nutritifs et l'âge.

Dans le Chapitre IV, j'examine les propriétés dites « acido-résistance » et « alcoolo-résistance », ainsi que l'action des radiations ultra-violettes.

Enfin je termine ces recherches en mentionnant l'action du milieu sur la morphologie et la virulence : c'est l'objet du Chapitre V.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548028_0036

CHAPITRE I.

CULTURE DU BACILLE TUBERCULEUX SUR MILIEU CHIMIQUEMENT DÉFINI

HISTORIQUE

La composition d'un milieu nutritif artificiel produisant dans un temps donné, pour un végétal donné, le maximum de culture et en produisant en outre un poids à peu près constant, est laborieuse à établir d'une façon précise. L'analyse des cendres ne renseigne qu'imparfaitement et incomplètement, donnant à la fois trop et pas assez : elle décèle en effet certains corps sans nécessité physiologique, tandis que d'autres à l'état de traces mais essentiels peuvent échapper ; elle varie en outre selon l'âge de la plante et la composition du milieu. Pour ces raisons, il n'est guère possible de résoudre le problème que par voie synthétique grâce à des tâtonnements méthodiques.

Le critérium du développement optimum (qui n'est pas forcément le développement normal) est le poids sec ; ayant obtenu ce développement optimum qu'aucune addition nouvelle n'améliore, on réduit progressivement les divers composants du milieu nutritif et on se rend compte de leur valeur alimentaire par le nouveau poids sec obtenu. C'est ainsi qu'opéra Raulin et son mémorable travail sur le *Sterigmatocystis nigra* est resté classique.

Chez les végétaux supérieurs le problème de la nutrition est relativement simple puisqu'ils empruntent directement le carbone à l'acide carbonique de l'air grâce à leur chlorophylle et qu'ils n'ont pas besoin de substances azotées complexes. Des trois formes d'azote — azote nitrique, azote ammoniacal, azote organique —, les travaux de Boussingault vérifiés par ceux de Muntz et de Mazé, par les recherches de Molliard, de Lefèvre, de Laurent et de Marschal, ont montré qu'à

la lumière les deux premières (azotates et sels ammoniacaux) sont parfaitement utilisées (les azotates surtout) et que parmi les composés azotés organiques, seules les substances amidées (asparagine, urée) peuvent être assimilées sous l'action de l'énergie solaire, les amines et les acides aminés ne l'étant pas en milieu aseptique. Boussingault montra également que l'azote atmosphérique n'est pas utilisé par les végétaux supérieurs et depuis les expériences de Hellriegell et Wilfarth on sait que s'il parait l'être chez certains d'entre eux, ainsi que chez certaines algues, il l'est en réalité d'une façon indirecte par l'intermédiaire de microorganismes formant avec le phanérogame une association symbiotique.

Une alimentation minérale exclusive, composée de corps cristallisables d'une composition chimique simple, suffit donc aux plantes vertes. Pourtant l'importance des aliments minéraux fut longtemps méconnue. Boussingault lui-même la niait encore en 1838, mais deux ans plus tard Liebig proclamait leur nécessité absolue et en 1842 Wiegmann et Polstorff employant la méthode des cultures sur sable faisaient connaître le rôle essentiel des principes minéraux dans la végétation. Depuis, de très nombreuses études furent faites principalement par Sachs, Knop, Stohmann, Nobbe, Oltmanus, etc...., et toutes concourent à démontrer qu'en dehors de l'hydrogène, de l'oxygène, du carbone et de l'azote, six corps simples paraissent nécessaires et suffisants pour le développement complet du végétal, à savoir : le phosphore, le soufre, le potassium, le calcium, le magnésium et le fer. — En outre, suivant les espèces, tel élément devra être dominant.

Le chlore dans certains cas semble remplir également un rôle utile : ainsi chez le sarrasin il aide à la migration des matières sucrées. D'après les travaux de G. Bertrand, le manganèse, au moins à l'état de traces, doit être considéré selon toute vraisemblance « comme un élément normal de l'organisme animal ou végétal où il jouerait un rôle essentiel dans les phénomènes oxydasiques » ; —à l'état de traces aussi, le bore interviendrait de même utilement dans la croissance des végétaux comme l'a montré Agulhon. Et même, depuis les minutieuses recherches de G. Bertrand, il est permis de se demander si les six corps simples énoncés plus haut demeurent

réellement suffisants et si d'autres minéraux, pour insoupçonnés et peut-être indécelables qu'ils sont dans l'état actuel de nos moyens d'investigation chimique, n'en sont pas moins nécessaires et n'existent pas soúvent à notre insu à l'état d'impuretés.

Avec les végétaux inférieurs, d'un maniement plus souple, les recherches peuvent être beaucoup plus approfondies et aussi plus précises à cause de la rapidité du développement de l'organisme et de la possibilité facile d'opérer toujours, au cours des diverses expériences, dans les mêmes conditions extérieures (éclairage, température, état hygrométrique), — à cause aussi de la possibilité d'ensemencer le liquide avec une spore ou une parcelle infime du végétal, ne représentant qu'un apport négligeable d'aliment. Tel est le cas pour les champignons et dans cet ordre de recherches la patiente étude que Raulin poursuivit de 1864 à 1870 sur le *Sterigmatocystis* demeure un modèle toujours cité ; c'est , dit Duclaux, « une des plus belles œuvres du commencement de la bactériologie ». On ne peut toucher à un seul chiffre du liquide de Raulin sans qu'aussitôt la plante ne ressente les effets de cette modification ; de plus, ce liquide convient si bien au *Sterigmatocystis* que point n'est besoin de faire un ensemencement aseptique et de le tenir à l'abri de toute contamination extérieure : à l'air libre et dans des vases non stérilisés le *Sterigmatocystis* se développe seul, formant une culture pure, abondante, qui détruit tout autre microorganisme.

Raulin reconnut comme nécessaires ou utiles au développement de la moisissure les mêmes éléments : phosphore, soufre, potassium, magnésium, fer, et en outre le zinc et la silice ; par contre le calcium n'est pas indispensable. D'autre part la fonction chlorophyllienne n'existant plus, une solution nutritive exclusivement minérale ne suffit pas et il faut donner au *Sterigmatocystis* un aliment hydrocarboné qui lui fournira le carbone nécessaire : Raulin a choisi le saccharose ; il acidifia en outre le milieu par de l'acide tartrique, reconnu depuis inutile en milieu stérile ; enfin comme source d'azote il donna des sels ammoniacaux dont un azotate (phosphate, sulfate et azotate d'ammonium), et la fixation de l'azote se fait grâce

à l'énergie reçue sous forme d'aliments hydrocarbonés. Mais le point nouveau et peut-être le plus intéressant du travail de RAULIN est la mise en lumière de l'influence considérable d'éléments secondaires tels que le zinc et le fer agissant à doses minimes, à la manière des agents catalytiques. L'action de traces de zinc sur la rapidité et l'optimum de développement est particulièrement remarquable. Contestée par COUPIN, puis par CH. LEPIERRE, elle fut définitivement mise en évidence par JAVILLIER qui, après purification soigneuse de tous les produits employés[1]), reconnut l'action du zinc sur le *Sterigmatocystis* à la dilution de 1/50.000.000e et constata que 0 mgr. 08 de ce métal dans un litre de liquide suffisait pour faire doubler la récolte, toutes choses égales d'ailleurs.

D'après cet auteur le zinc, fixé par les cellules du *Sterigmatocystis*, réduirait les dépenses d'entretien en hydrates de carbone et azote ammoniacal en faveur de la construction de nouveaux tissus (dans les cendres les proportions de soufre et de magnésium diminuent alors que celles de phosphore, de silicium et de fer augmentent).

Au point de vue de l'augmentation de la récolte un aliment est en effet d'autant plus profitable qu'il s'emploie moins et moins longtemps à entretenir la vie des cellules déjà formées. Si le liquide de RAULIN convient si bien à la culture du *Sterigmatocystis* c'est qu'il donne dans le temps le plus court le maximum de récolte et que la période pendant laquelle les cellules déjà formées continuent à consommer du sucre sans augmenter de poids est réduite à son minimum.

---

[1]) Sans doute l'emploi de produits très purs est indispensable si l'on veut établir un bilan des corps nécessaires et suffisants pour le développement optimum ; toutefois au point de vue absolu il est impossible de constituer un milieu rigoureusement pur de tel ou tel élément et, quel que soit l'état de grande pureté chimique des sels employés, on ne saurait affirmer que la plante ne trouvera pas dans le mélange qu'on lui offre le corps dont a voulu la priver ; son organisme est en effet un réactif autrement sensible que la plupart de nos procédés chimiques. Le *Sterigmatocystis* ne peut vivre dans un capsule d'argent et pourtant les réactifs si sensibles de ce corps sont impuissants à déceler sa présence dans le liquide ; d'autre part, d'après G. BERTRAND, les vases de verre que l'on emploie apportent souvent une cause d'erreur : le verre de bohème usuel peut laisser se dissoudre de la potasse, de la chaux, etc...., — et JAVILLIER a montré que la présence du zinc dans le verre des vases de culture pouvait, comme l'avait déjà signalé G. BERTRAND au sujet du manganèse, bouleverser les résultats expérimentaux dans l'étude du *Sterigmatocystis*.

Une semblable influence favorable au développement du *Sterigmatocystis* est exercée par des quantités plus minimes encore de manganèse et G. Bertrand, opérant dans des conditions d'excessive rigueur, a pu reconnaître que ce métal à l'extrême dilution de 1 déci-milliardième augmente le rendement de plus de la moitié.

Favorables également sont le cuivre, le cadmium, le glucinium et l'uranium ; au point de vue puissance catalytique le cadmium présenterait même une certaine analogie d'action avec le zinc (Javillier). Enfin l'adjonction simultanée de zinc et de manganèse produit une augmentation de récolte supérieure à la somme des effets obtenus par l'addition d'un seul de ces métaux (G. Bertrand et Javillier).

A la suite du travail purement spéculatif de Raulin qui avait établi le principe fécond de donner à chaque espèce le meilleur terrain qui pût lui convenir, des recherches d'un intérêt pratique plus immédiat, à cause de leur importance industrielle, furent faites sur l'alimentation des *Saccharomyces*. Les expériences de Ad. Mayer, corroborées par celles d'Elion et de Kusserow, établirent, ici encore, la nécessité des mêmes aliments minéraux : phosphore, soufre, potassium, magnésium, fer. Stern insista particulièrement sur la présence nécessaire du soufre et constata par contre que le fer n'était pas indispensable. D'autre part le remplacement réciproque de toutes les bases alcalino-terreuses admis par Nœgeli, en particulier celui de la magnésie par la chaux, ne put être réalisé par Molisch Benecke, Winogradsky, etc..., dont les travaux confirmèrent l'absolue nécessité du magnésium et l'impossibilité de le remplacer par le calcium ; ce dernier, d'après les recherches de Melle Th. Robert aurait une action indifférente sur le développement des végétaux inférieurs.

Comme source d'azote, les sels ammoniacaux (sulfate et tartrate d'ammonium) suffisent aussi à la levure pour élaborer sa matière albuminoïde, et à l'inverse des végétaux supérieurs elle les préfère très nettement aux nitrates (travaux de Pasteur, puis de Laurent et de Duclaux). Toutefois il y a lieu de distinguer la levure considérée comme végétal et la levure considérée comme ferment, et cet antagonisme rend le problème de l'alimentation plus compliqué et plus difficile à résoudre. Les

recherches de HESS, HAYDUCK, DUCLAUX, LANG, J. LABORDE, etc...., firent connaître que plus un aliment azoté représente une forme dégradée d'azote, c'est-à-dire plus il se rapproche du terme final AzH^3, plus il est favorable au développement du pouvoir ferment, et le pouvoir ferment est en raison inverse de la multiplication de la levure ; – c'est-à-dire, par exemple, que la peptone conviendra mieux au développement végétatif et l'asparagine mieux à l'activité fermentaire. Quant aux substances hydrocarbonées que la levure peut utiliser pour construire ses cellules, leur nombre est considérable ainsi que le constata LAURENT. Sans doute leur utilisation varie et la levure montre évidemment des préférences ; d'ailleurs ici encore le problème se complique par le mélange de vie aérobie et anaérobie que présente le saccharomyces ; en outre, les résultats de LAURENT ne sont relatifs qu'aux conditions dans lesquelles ils ont été obtenus : dans son milieu la seule source d'azote est le sulfate d'ammonium, or avec une substance azotée plus complexe c'est-à-dire dans un milieu minéral plus favorable à sa multiplication, la levure utiliserait mieux peut-être certaines substances organiques.[1])

Pour les Bactéries, qu'elles soient aérobies ou anaérobies, les milieux de culture, solides ou liquides, devront contenir également des matières azotées, des hydrocarbones[2]) et des sels puisque, comme toutes les cellules vivantes, les microbes sont constitués par ces trois catégories de substances. Dans leurs cendres on retrouve d'une façon constante les mêmes éléments déjà reconnus comme essentiels au développement des levures, des moisissures et des végétaux supérieurs : le phosphore, le soufre, le potassium et le magnésium. La nécessité de ces corps simples apparait donc comme générale dans l'alimentation de tous les végétaux. En ce qui concerne le calcium, déclaré inutile pour les végétaux inférieurs, PICHARD

[1]) Ainsi l'urée rangée par LAURENT parmi les substances inassimilables peut très bien être utilisée dans d'autres conditions d'existence. Ainsi encore la levure se multiplie abondamment dans du jus de raisin dont l'acidité est très élevée (12 à 15 gr. d'ac. tartrique p. 1000) alors que dans des milieux artificiels même les plus favorables la levure ne supporte pas une acidité supérieure à 3 ou 4 gr. p. 1000.

[2]) Exception faite peut-être pour les bactéries pourpres — encore que la bactériopurpurine ne soit pas considérée par tous les auteurs comme un pigment assimilateur de carbone.

et plus tard Dehérain signalèrent l'action favorisante des amendements calcaires sur le développement des bactéries nitrifiantes, et même Dehérain avec Demoussy trouvèrent que si les bactéries de certaines légumineuses existent dans les milieux acides (terre de bruyère) elles pullulent seulement dans les sols calcaires.

Ce fut Pasteur qui imagina de faire développer les bactéries dans des solutions salines, les sels étant fournis par des cendres de levures. En remplacement de celles-ci Cohn[1]) et, à sa suite, les bactériologistes qui ont cultivé les microbes sur des milieux chimiques définis ont toujours employé les corps minéraux cités plus haut, auxquels parfois ils en ont adjoint d'autres jugés utiles et qui changent d'ailleurs selon les auteurs et le microbe étudié. Très variable également est la nature des aliments carbonés et azotés choisis ; ces derniers pouvant être des matières albuminoïdes diffusibles (peptone) ou leurs produits de désintégration (ac. aminés, asparagine, leucine) voire des molécules azotées déjà minéralisées (nitrates et sels ammoniacaux).

Ainsi Arnaud et Charrin (1891) dans leurs « recherches sur les sécrétions microbiennes » s'étaient servis d'un milieu contenant, outre des sels minéraux, de l'asparagine.

Gessard (1891) dans ses expériences sur les races de bacille pyocyanique essaya le succinate d'ammonium, et Péré (1892) pour ses travaux sur le coli-bacille et le bacille typhique employa les lactates et succinates d'ammonium ou de sodium.

Ouchinsky (1893) étudiant la nature des poisons de la diphtérie et du choléra avait préconisé un milieu synthétique avec glycérine, lactate d'ammonium et asparagine.

Frankel et Voges (1894) employèrent ces mêmes corps pour la culture du coli-bacille et du bacille pyocyanique et plus tard pour celle du bacille tuberculeux.[2])

---

[1]) Formule de Cohn

Phosphate bipotassique	1 gr.
» tricalcique	0.10
Sulfate de magnésium	1
Tartrate d'ammonium	2
Eau dist.	200 cm³

[2]) Formule de Frankel et Voges

Phosphate trisodique	2 gr.
Chlorure de sodium	5 »
Lactate d'ammonium	5 »
Asparagine	4 »
Eau	1000 cm³

Addition de 50 à 60 gr. de glycérine pr. la culture du bac. tuberculeux.

A. Berthelot (1909-1912) pour ses recherches sur les microbes producteurs d'indol utilisa et étudia comparativement le tryptophane, la tyrosine, le glycocolle, l'alanine, la leucine, la créatine, la cystine, la glucosamine.

Mais, à la vérité, dans la pratique courante les milieux composés exclusivement de corps simples chimiquement définis ont été peu employés pour les bactéries car les méthodes de la bactériologie n'ont pas été créées en vue de l'étude chimique ultérieure des milieux de culture. On se sert surtout de liquides ou humeurs naturels, ou de macérations, infusions ou bouillons de tissus animaux ou végétaux, rendus souvent plus nutritifs par addition de divers peptones ou sucres.

Pour le bacille tuberculeux qui nous intéresse spécialement le milieu classique généralement employé dans les laboratoires est le bouillon de viande glycériné, additionné de peptone et de chlorure de sodium et rendu légèrement alcalin. Certes la constitution d'un milieu si complexe, variable selon la qualité de la viande et son état de fraicheur, défie toute analyse ; de plus, comme le dit Grimbert, il y a presque autant de manières de le préparer qu'il y a de laboratoires. Néanmoins bien des chimistes ont tenté cette analyse et la liste des substances définies qu'ils ont trouvées est déjà fort longue : A côté des sels minéraux (principalement KCl, PO^4K^2H, PO^4MgH) et du glucose, des dextrines, de l'urée de l'acide urique, signalés par divers auteurs, Liebig y décela de la créatine, de la créatinine, de l'acide inosique, de l'acide sarcolactique; Wislicenus, de l'acide oxypropionique ; Strecker, de la sarcine ; Scherer, de la xanthine et de l'inosite ; A. Gautier une série de ptomaïnes : xanthocréatine, chrysocréatinine, amphicréatine, pseudoxanthine et des bases non dénommées.

Bouveault (1892) qui essaya une analyse méthodique d'un bouillon de viande de veau[1]) en isola à l'état de pureté ces mêmes

[1]) Préparation du bouillon de Bouveault : dans 1500 cm^3 d'eau mettre 1000 gr. de viande de veau dégraissée et coupée en menus morceaux ; porter à l'ébullition pendant 4 à 5 heures jusqu'à ce que le liquide soit réduit à 1 litre environ ; filtrer le liquide chaud sur filtre mouillé et l'additionner de peptone 12 gr., sucre 20 gr., glycérine 60 gr.; ajouter dans le liquide chauffé du carbonate de sodium jusqu'à réaction légèrement alcaline au tournesol, et abandonner le tout au bain-marie 2 à 3 heures; compléter exactement le volume à 1 litre, filtrer chaud et stériliser à 120°.

substances (créatine, créatinine, xanthine, bases des séries de la xanthine et de la créatinine, ac. sarcolactique, inosite, sarcine, sels d'amines volatiles) et dans quelques cas put en faire des dosages approximatifs.

D'ailleurs il est juste de reconnaître que le bouillon peptoné glycériné, dans lequel le microbe sait faire le choix des éléments qui lui conviennent, constitue nn excellent milieu de culture pour le développement du bacille tuberculeux et les bactériologistes ne désiraient pas autre chose.

Pourtant en 1889 déjà, Hippolyte Martin[1]) fit connaître que le bacille tuberculeux pouvait très bien végéter sur des milieux chimiquement définis, – et en Allemagne, dans le laboratoire de Koch, des recherches furent entreprises par Kuhne (1893) et surtout par Proskauer et Beck (1894) qui, cherchant à établir un minimum d'aliments, essayèrent de nombreuses formules[2]). Ils reconnurent comme éléments minéraux nécessaires le phosphore, le potassium, le magnésium ; le chlore et le sodium qu'ils employèrent quelquefois sous forme de chlorure de sodium leur parurent moins utiles ; l'azote était fourni sous forme minérale ou sous forme organique, et l'alimentation hydrocarbonée était assurée par la glycérine à laquelle furent joints parfois des sucres, ou des acides organiques, ou des alcools polyatomiques, – mais la glycérine s'est montrée indispensable. En faisant varier les doses des divers éléments ils obtinrent toujours des cultures sensiblement égales.

C'est d'un milieu nutritif analogue à ceux que Proskauer et Beck expérimentèrent, que se servirent Lowenstein et Pick (1911) pour leur étude sur la tuberculine. Toutefois il

[1]) Milieu de H. Martin :

Phosphate monopotassique	gr. 2,50
Chlorure de sodium	3,50
Sulfate de sodium	7,50
Tartrate d'ammonium	2,50
Sucre	30
Gélose	10
Glycérine	30
Eau	q.s.p. 500cm³

[2]) Formules, parmi les plus simples, ayant donné de bons résultats à Proskauer et Beck :

(a) avec Azote minéral :

Phosphate monopotassique	gr. 5
Sulfate d'ammonium	2
Citrate de magnésium	2,50
(Mannite	6)
Glycérine	15
Eau	q.s.p. 1000 cm³

(b) avec Az. organique :

Phosphate monopotassique	gr. 5
Sulfate de magnésium	2,50
Asparagine	4
Glycérine	15
Eau	q.s.p. 1000 cm³

n'y entre ni soufre, ni potassium, ni magnésium et il a qualitativement la même composition que le milieu utilisé par Frankel et Voges.[1])

Un moment abandonnés, semble-t-il, ces essais furent repris en France au cours de ces dernières années par divers bactériologistes, essais concernant non pas seulement les combinaisons alimentaires les plus favorables à la nutrition du bacille, mais encore parfois les variations consécutives de sa virulence.

Calmette, Massol et Breton (1909)[2]) ont étudié la valeur alimentaire de diverses substances azotees ajoutées à un milieu minéral fixe contenant d'autre part soit de la glycérine, soit du glucose, soit l'une et l'autre. Comme aliment azoté ils préconisent la peptone (10 gr. par litre), l'asparagine (2 gr. 50 par litre), ou le succinimide (2 gr.,50 par litre) et comme substance ternaire la glycérine (40 gr. par litre) ; le glucose (10 gr. par litre), substitué à celle-ci, diminue la récolte de moitié, mais son adjonction à la glycérine double presque le rendement.

Baudran (1909–1910)[3]) eut l'idée de donner au bacille tuberculeux des éléments minéraux sous forme de glycérophos-

[1]) Milieu de Lowenstein et Pick

Chlorure de sodium	gr. 6
Phosph. trisodique	... 3
Lactate d'ammonium	6
Asparagine	 6
Glycérine	 40
Eau	 1000

[2]) Milieu minéral de Calmette, Massol, Breton

Carbon. de sodium	gr. 1
Chlorure de sodium	... 8,5
Sulfate de fer	 0,04
Su fate de magnésium	0,05
Phosph. monopotassique	 1
par litre	

D'après les auteurs, le carbon. de sodium doit être supprimé si l'on emploie comme aliment azoté la peptone ou l'asparagine; il est utile au contraire avec le succinimide ; indifférent avec les autres substances azotées (phosphate, citrate et tartrate d'ammonium, succinamide, succinate d'ammonium, leucine, tyrosine).

[3]) Milieu de Baudran

Glycérophosphate de potassium	.....gr. 0.60
Glycérophosphate de sodium	 2,24
Glycérophosphate de calcium	 1,20
Glycérophosphate de magnésium	 1,76
Citrate de sodium (pr. solubiliser)	 4
Albumose Byla	 10
Glycérine	 50
Eau dist. q.s.p.	...1000 cm³

Baudran étudiant sur ce milieu les doses de Fe. et de Mn. qui peuvent être supportées par le bacille donne comme dose *maxima* dans 1 litre de liquide nutritif : 3 gr. 10 pour le fer, et 3 gr. pour le manganèse (sous forme de glycérophosphate). Mais il emploie couramment la dose de 0 gr. 20 p. litre

phates « pour éviter au microbe des transformations ultérieures»; il composa ainsi un milieu avec des glycérophosphates de potassium, de sodium, de calcium et de magnésium auxquels il ajouta de l'albumose et de la glycérine. En outre par addition de glycérophosphate de fer ou de manganèse il constata des modifications dans la morphologie et la virulence du bacille.

Frouin (1910)[1]) cultiva le bacille tuberculeux sur un milieu minéral qu'il avait reconnu favorable déjà pour le développement de la plupart des espèces microbiennes et auquel il adjoignit de la glycérine, de la glucosamine et de la sarcosine. « Ce milieu, dit-il, étant ensemencé avec des bacilles adaptés par de nombreux passages sur bouillon de viande peptoné et glycériné, on observe pendant les deux premières semaines un retard dans le développement. Au bout de ce temps la culture se développe et après 4 semaines on a une culture abondante avec voile épais ».

Tiffeneau et Marie (1912) ont cherché à préciser d'une part quelques unes des conditions les plus favorables au développement du bacille tuberculeux en milieu glycériné minéral, et d'autre part la dose utile des divers aliments. Leur étude a porté sur une des plus simples parmi les nombreuses formules expérimentées par Proskauer et Beck (formule (a) page 9) et ils sont arrivés aux conclusions suivantes : 1° tandis qu'en bouillon peptoné le développement du bacille tuberculeux exige une certaine alcalinité, c'est le contraire qui s'observe avec le milieu glycériné minéral étudié, et l'acidité optima évaluée en soude (à la phénolphtaléine) oscille entre 0 gr.,05 et 0 gr.,08 p. 100 cm³ (soit 12 cm³, 50 à 20 cm³ de liqueur N. par litre) ; — 2° après un séjour de 10 semaines à 37°, qui donne dans les meilleurs cas 4 grammes de bacilles secs par litre de culture, le liquide filtré renferme encore plus des 3/4

---

[1]) Milieu de Frouin

Chlorure de sodium	6 gr. p. 1000 cm³
Chlorure de potassium	0,3
Chlorure de calcium ...	0,15
Phosph. disodique	0,5
Sulfate de magnésium	0,3
Glycérine	40
Glucosamine	2
Sarcosine	2

La solution est neutralisée.

du phosphore initial fixé par Proskauer ($PO^4 KH^2$: 5 gr. par litre); — 3° après 8 mois de culture la quantité d'ammoniaque retrouvée n'est plus que le 1/3 de la quantité initiale ($SO^4 (Az H^4)^2$: 2 gr. par litre) ; — 4° les milieux de culture sont encore excellents avec 4 fois moins de magnésie (dose initiale de SO^4 Mg. : 2 gr., 5 par litre) ; — 5° la mannite (6 gr. par litre) est retrouvée presque intégralement et la récolte ne parait pas diminuée par sa suppression ; — 6° dans certains cas, après 10 mois de culture, la totalité de la glycérine (15 gr. par litre) était utilisée. Enfin, d'après Tiffeneau et Marie, des composés phosphorés organiques comme la lécithine, même en petites quantités, s'opposent au développement du bacille.

A. Delille, Mayer, Schaeffer et Terroine (1912—1913) procédant par voie analytique contrairement aux autres chercheurs qui tous ont employé la voie synthétique suivie par Raulin, constatèrent que le bacille cultivé sur bouillon de viande non additionné de peptone donne un développement faible, parfois nul ; — que d'autre part ensemencé sur une solution de peptone du commerce avec glycérine et sel, sans bouillon, il donne un développement variant avec la nature de la peptone (moyen avec peptone Chapoteaut, pauvre avec peptone Vitte, très pauvre avec peptone de soie) mais en tout cas inférieur à celui obtenu sur bouillon peptoné. Ils reconnurent en outre que les peptones préparées à partir de la chair musculaire soit par action diastasique, soit par l'acide chlorhydrique, donnent un développement très abondant, et enfin que si l'on ajoute du bouillon aux peptones commerciales qui ne permettaient qu'un faible développement on obtient de très riches cultures, d'autant plus riches que la peptone employée a une teneur plus élevée en acides aminés (peptone de soie d'abord, puis peptone Vitte, puis peptone Chapoteaut). Partant de ces faits ils composèrent en quelque sorte un bouillon de viande synthétique contenant, outre les sels minéraux, des acides aminés et des matières extractives, puis du glucose, de la glycérine et de l'inosite comme substances ternaires

(milieu 104)[1]). Ce milieu donne un voile épais qui couvre la surface du liquide en moins de 15 jours.

Plus tard (1913) les auteurs firent connaître un milieu plus simple (milieu 164) [2]) donnant des cultures aussi belles et aussi rapides que le précédent, «atteignant en 8 jours le développement qui demande 3 semaines sur bouillon peptoné ». Il contient les mêmes sels minéraux, mais un seul acide aminé (du glycocolle) comme substance azotée, et un acide diaminé (de l'arginine) en remplacement des substances extractives. Ainsi, contrairement aux plantes vertes, le bacille tuberculeux utilise et assimile parfaitement les acides aminés.

Frouin (1912) [3]) à la suite de recherches ayant trait à l'influence des sels de vanadium et de terres rares sur le bacille

---

[1]) Milieu 104

Chlorure de sodium	gr. 1,25
Phosph monopotassique	1,25
Citrate de magnésium	0,60
Glycocolle	0,50
Ac. aspartique	0,50
Nitrate de carnosine	0,10
Créatine	0,10
Sarcosine	0,10
Glucose	0,50
Inosite	0,10
Glycerine	10
Eau	250
Soude N	1 cm³ ajouté après neutralisation.

[2]) Milieu 164

Chlorure de sodium	gr. 1,25
Phosph. monopotassique	1,25
Citrate de magnésium	0,60
Glycocolle	1
Arginine	0,50
Glucose	1
Glycérine	
Eau	250
Soude N	1 cm³ ajouté après neutralisation.

Auparavant les auteurs avaient utilisé les substances protéiques naturelles les plus riches en ac. diaminés : les protamines (sulfate de scombrine : Milieu 118).

[3]) Milieu de Frouin

Phosph. dipotassique	gr. 1
Sulfate de magnésium	1
Citrate de sodium	1,50
Lactose (ou glucose)	3
Asparagine	5
Glycérine	40
Eau dist.	1000

Dans un certain nombre d'expériences Frouin a fait varier les doses de ces diverses substances, mais il a toujours obtenu une culture sensiblement égale, confirmant ainsi les constatations de Proskauer et Beck. Il a paru en outre à Frouin que l'addition d'un sucre, glucose ou lactose, augmentait sensiblement la récolte.

pyocyanique, étudia l'action des mêmes sels sur le développement du bacille tuberculeux. Il se servit d'un milieu différent de celui qu'il avait établi auparavant et rappelant ceux de PROSKAUER et BECK, c'est-à-dire renfermant de l'asparagine comme aliment azoté puis de la glycérine comme aliment hydrocarboné. Par addition de vanadate de sodium à petites doses (0 gr.,04 à 0.gr.,20 pour 100 cm³ de liquide nutritif) la récolte se trouve augmentée considérablement. Le développement est également favorisé par des quantités très minimes (0 gr., 005 au maximum pour 100 cm³ de liquide nutritif) de sulfate de cérium, de lanthane, de néodyme, de praséodyme (ces deux derniers se montrent antiseptiques à la dose de 0 gr.,1 pour 100cm³ et empêchent tout développement du bacille tuberculeux). En outre FROUIN constata que ces divers sels, quoique se classant au point de vue chimique parmi les alcalino-terreux, ne pouvaient remplacer le magnésium dans son milieu de culture et permettre à eux seuls le développement du bacille.

SAUTON (1912) [1]) partant d'un milieu formé de produits soigneusement purifiés et contenant comme éléments minéraux du soufre, du phosphore, du potassium, du magnésium et du fer, a cherché quelle était, toutes choses égales d'ailleurs, la valeur alimentaire de ces corps. Il reconnut tout d'abord que la culture était impossible en l'absence de phosphore et de potassium et que ce dernier métal ne pouvait être remplacé par le sodium, le lithium ou le césium, mais qu'il était indifférent de lui substituer en partie le rubidium. Le milieu complet donnant une récolte de 0 gr., 95 (bacilles secs) pour 100 cm³ de liquide après 20 jours de culture, le poids de récolte tombe à 0 gr., 01 si on supprime le magnésium, à 0 gr., 04 si on supprime le soufre, à 0 gr.,32 si on supprime le fer. Le manganèse ne peut être substitué au fer. L'addition de calcium, manganèse, zinc, bore, vanadium, aluminium, ne lui a paru produire au-

---

[1]) Milieu de SAUTON

Phosph.dipotassique	gr0,50
Sulfate de magnésium	0,20
Ac. citrique.....	2
Citrate de fer ammoniacal	0,05
Asparagine	4
Glycérine	60
Eau dist.	1000

cune modification dans les expériences qu'il fit. Enfin la présence de la glycérine est nécéssaire ; elle ne peut être remplacée par les alcools polyvalents ou les sucres.

P. Becquerel (1913) étudia l'influence des sels radioactifs d'uranium et de thorium (azotates) sur le développement du bacille tuberculeux. Ajoutés en proportions croissantes à du bouillon de veau glycériné, ils montrent une dose optima bien limitée (voisine de 0 gr., 0004 pour le thorium, de 0 gr.,00004 pour l'uranium) qui produit chez le bacille un maximum d'excitation de ses fonctions assimilatrices. Au-dessus de cette dose les fonctions de nutrition sont de plus en plus ralenties jusqu'à disparaître ; au-dessous, il n'y a plus d'action visible et la croissance se fait normalement.

Frouin (1913) dans une nouvelle série de recherches constata que les sels d'uranium (acétate ou sulfate : de 0 gr., 1 à 0 gr., 001 pour 100 cm³ de liquide nutritif) ne favorisaient pas le développement du bacille et que seul le thorium (sulfate: de 0 gr., 01 à 0 gr., 001 pour 100 cm³ du liquide nutritif) avait une légère action favorisante. Ces résultats qui s'appliquent au milieu chimique de Frouin sont en contradiction avec ceux de Becquerel, mais indépendamment de la différence de milieux employés il y a aussi une différence de mesure : Becquerel évalue en effet l'action des sels essayés d'après la surface du voile alors que Frouin l'évalue d'après son poids, ce qui est plus précis.

Des expériences ultérieures (1920) montrèrent à Frouin que si la présence d'un sucre (glucose, lévulose, lactose, maltose) dans le milieu asparagine-glycérine favorisait à des degrés divers le développement du bacille tuberculeux, l'addition à ces milieux sucrés de terres du groupe cérique, même à la dose de 1/40000e, diminuait le développement du bacille, contrairement aux faits observés précédemment en milieu non sucré. De plus, si la culture ainsi développée en présence des sulfates de terres cériques est réensemencée sur un milieu identique contenant la même dose de sels, elle ne se développe que très faiblement ou ne se développe pas du tout. Il n'y a donc pas dans ces conditions accoutumance du microbe vis-à-vis des terres rares, mais au contraire augmentation très nette de l'action empêchante de celles-ci.

Frouin reconnut d'autre part que le bacille tuberculeux pouvait encore se développer sur des milieux renfermant 4, 6 et même 8 gr. de soude par litre. A la concentration de 8 gr. le développement est peu abondant ; à des concentrations plus élevées il n'y a plus de développement. Ces résultats furent obtenus sur bouillon de pomme de terre glycériné (50 gr. par litre) et lactosé (5 gr. par litre) ainsi que sur milieux chimiquement définis renfermant un acide aminé (asparagine, ou acide glutamique, ou alanine), de la glycérine et un sucre (glucose ou lactose).

Besançon, Philibert et Boudin (1913) ont cherché à préciser eux aussi la nécessité ou simplement l'utilité des divers corps minéraux ou organiques employés dans les bouillons synthétiques. La réaction acide leur a paru la plus favorable et l'acidité optima égale à 0 gr., 70 d'acide phosphorique par litre, qui est sensiblement celle indiquée par Tiffeneau et Marie. Le milieu [1]) qui avec cette acidité donne un voile couvrant toute sa surface en 22 jours, donne par contre une culture presque nulle avec une acidité de 1 gr. d'acide phosphorique par litre ; il n'est recouvert d'un voile complet qu'en 1 mois 1 /2 s'il est neutre, et qu'en 3 mois seulement s'il est alcalinisé avec 1 gr. de potasse par litre. Comme la majorité des auteurs qui ont étudié cette question et contrairement aux résultats de Frankel et Voges et à ceux de Lowenstein et Pick ils ont reconnu la nécessité du potassium qui ne saurait être remplacé par le sodium : c'est bien d'ailleurs l'absence de potassium et non la nocivité du sodium qui intervient, car même en présence de quantités notables de ce métal la culture se développe s'il y a du potassium. La dose de phosphate de potassium la plus favorable leur a semblé être de 0 gr., 10 à 0 gr., 50 par litre. Ils ont reconnu de même la nécessité du magnésium (à la dose de 2 gr., 50 à 4 gr., 50 par litre), que ne sau-

---

[1]) Essais faits avec le milieu de Proskauer et Beck, ainsi modifié :

Phosphate monopotassique	gr.0,50
Acide phosphorique	0,70
Sulfate de magnésium	4,50
Succinate d'ammonium	4,60
Glycérine	35
Eau dist. q.s.p.	1000

A noter que dans ce milieu l'acidité est en réalité égale à 0 gr., 88 d'ac. phosphorique par litre, à cause de la présence de 0 gr. 50 de phosph. monopotassique.

rait remplacer le silicium ; le chlorure de sodium non seulement ne serait pas nuisible même à haute dose (10 gr., par litre) mais encore il leur a paru favorisant à la dose de 2 gr., 50 par litre. Par contre l'addition de fer ou de manganèse ne leur a donné aucune augmentation de récolte. Comme éléments azotés ils ont étudié comparativement ceux que déjà Calmette, Massol et Breton avaient expérimentés : le nitrate de potassium et le nitrate d'ammonium ne peuvent être utilisés parce que toxiques ; le succinamide sans être toxique est un médiocre aliment ; l'asparagine, très favorable, serait inférieure néanmoins au succinate d'ammonium. Comme substance ternaire ils n'ont pu parvenir à supprimer ou remplacer la glycérine dont la proportion optima leur a semblé être 35 gr. par litre ; enfin l'adjonction de lactose et de citrate de sodium leur a paru propice bien que le rôle de ces corps soit difficile à expliquer, et en définitive les auteurs se rallient à l'emploi du milieu utilisé par Frouin (page 13).

Tout récemment (1922) A. Borrel, de Coulon, Boez et Guimaud ont composé un milieu [1]) renfermant également comme celui de Frouin de la glycérine et du glucose, mais spécialement riche en constituants minéraux. Au 20e jour de culture, ils obtiennent une récolte de 0 gr., 50 à 1 gr. de bacilles secs sur 140 cm³ de liquide nutritif placés dans de larges boîtes de Roux.

Tels sont les principaux milieux chimiquement définis, plus ou moins complexes, établis pour la culture du bacille tuberculeux. — J'ajouterai que sur ce point, pas plus pour les Bactéries que pour les Levures, il n'existe un travail ayant la rigueur de celui fait sur le *Sterigmatocystis* ; en particulier on

[1]) Milieu de Borrel, Coulon, Boez et Guimaud.

Sulfate monopotassique	gr. 0,25
Phosphate dipotassique	0,50
Sulfate de magnésium	0,25
Nitrate de sodium	1
Carbonate d'ammonium	1
Silicate de potassium	0,02
Sulfate de fer	0,03
Asparagine	4,50
Glucose	5
Mannite	5
Glycérine	20
Eau dist.	1000

ne réalisa pour aucune espèce un milieu d'élection tel qu'elle se défendît d'elle-même et victorieusement contre l'intervention de tout autre microorganisme, et donnât des cultures pures au contact de l'air dans des liquides et des vases non stérilisés. — Etait-ce d'ailleurs possible ? — Quoi qu'il en soit, l'œuvre de longue haleine accomplie par RAULIN ne fut jamais renouvelée. Appliquée aux Bactéries, elle eût peut-être été vaine. Au reste les recherches faites depuis RAULIN sur la culture du *Sterigmatocystis* ont montré que son œuvre elle-même était encore perfectible et que ses conclusions étaient trop absolues.

RECHERCHES PERSONNELLES

I.

COMPOSITION DU MILIEU.

Mon dessein n'étant pas de chercher à réaliser pour le bacille tuberculeux le milieu de culture optimum mais d'étudier certains points de sa biologie, j'ai tout d'abord, pour faciliter mes recherches, composé un liquide nutritif très simple avec les seuls éléments : phosphore, soufre, potassium, magnésium, glycérine et asparagine, dans les proportions suivantes :

Phosphate monopotassique . .	1 gr., 50
Sulfate de magnésium	1
Asparagine	10
Glycérine neutre (D : 1,26) . .	40
Eau distillée q. s. p.	1000 cm³

Je me suis servi de corps livrés chimiquement purs et que j'ai purifiés encore par plusieurs cristallisations ; mais il convient quand même de demeurer circonspect au sujet de l'absence absolue des «infiniment petits chimiques» selon l'expression de G. BERTRAND, et qui, comme le zinc ou le manganèse, peuvent agir à des doses indécelables par les méthodes chimiques seules.

Le liquide nutritif était réparti dans des ballons de 250 cm³ à raison de 50 cm³ par ballon, offrant une surface de 44 à 45 centimètres carrés et une hauteur de 1 cm. 1/2. Il était stérilisé à l'autoclave à 115° pendant 20 minutes. L'ensemence-

ment était fait avec une öse de voile agé de 8 à 10 jours provenant d'un développement de bacilles tuberculeux humains sur bouillon peptoné-glycériné [1]). Puis les ballons étaient placés à l'étuve à 37—38°.

Le développement est rapide et abondant ; au 6e jour une pellicule ténue, réticulée, couvre toute la surface du liquide et grimpe même légèrement le long des parois du ballon ; au 12e jour le voile est épais, gaufré ; au 20e jour la récolte moyenne par ballon (établie sur 4 ballons) est de 2 gr., 15 de bacilles frais, soit 0 gr., 357 à l'état sec. [2])

En substituant le sodium au potassium ou au magnésium, je n'ai pas obtenu de développement microbien : résultat attendu et confirmant ceux de Sauton, puis de Bezançon, Philibert et Boudin. Si le milieu de Lowenstein et Pick s'est montré favorable au bacille, bien que dépourvu de ces deux métaux, il est donc probable que ceux-ci existaient néanmoins comme impuretés à l'insu des auteurs. — Aucun développement appréciable n'a eu lieu de même en remplaçant le sulfate de magnésium par une quantité équivalente de citrate, c'est-à-dire en supprimant le soufre.

On ne peut davantage remplacer le phosphore par un métalloïde de même famille, en particulier par l'arsenic. Pasteur l'avait constaté déjà pour d'autres microorganismes et si Bouilhac a prétendu que cette substitution pouvait être faite dans certains cas, ses conclusions ont été contestées. — Ce

[1]) Les bacilles ensemencés avaient été isolés au Laboratoire du Sanatorium (Une parcelle d'expectoration bacillifère, délayée dans un peu d'eau salée physiologique, est injectée à une cobaye que l'on tue un mois environ après l'inoculation. La rate de l'animal étant prélevée et broyée aseptiquement, la pulpe splénique sert aux frottis sur pomme de terre glycérinée et une partie du léger voile qui se développe simultanément sur le liquide, au fond du tube de culture, sert à l'ensemencement du bouillon peptoné).

[2]) Le contenu du ballon, non stérilisé, est versé dans un entonnoir dont la douille est garnie de coton un peu serré ; on lave à l'eau distillée et après égouttage, on recueille dans une capsule tarée la masse bacillaire que l'on mélange soigneusement pour la rendre aussi homogène que possible. On pèse. De cette masse une partie du volume d'un pois environ, étalée sur le fond d'une capsule ou d'un verre de montre tarés, est pesée, puis portée 1 heure à l'étuve à 105° et pesée de nouveau : la perte de poids donne l'humidité de la partie prélevée et permet de calculer le poids sec du voile bacillaire total. — La teneur en eau des bacilles varie d'ailleurs un peu avec leur origine et davantage avec le milieu nutritif ; j'indiquerai ces différences dans le Chapitre III en étudiant la composition du bacille tuberculeux.

n'est pas que l'arsenic soit essentiellement toxique pour le bacille tuberculeux. CHARPENTIER aurait même obtenu sur bouillon glycériné des cultures de bacilles tuberculeux bovins aussi riches lorsque le bouillon renferme 1 /162e de son poids d'arséniate de soude. Je n'ai pas observé une telle indifférence en ajoutant à mon milieu, en outre du phosphate qu'il renferme, 1 gr., 50 d'arséniate monopotassique par litre (l'acidité du milieu ayant été maintenue semblable), et si cette addition n'empêche pas le développement du bacille, elle exerce néanmoins déjà une action empêchante : en effet, 1 mois après l'ensemencement la culture, dans les ballons, ne recouvre que les 3/4 de la surface du liquide ; le voile d'ailleurs n'est pas homogène mais constitué par des îlots séparés. — Quoi qu'il en soit, en supprimant le phosphate et en ne laissant dans le liquide nutritif que l'arséniate, je n'ai plus obtenu de culture appréciable, ni avec des bacilles humains, ni avec des bacilles bovins.

2.

INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU.

Le milieu ci-dessus est acide et, si l'on prend la phénolphtaléine comme indicateur, cette acidité est équivalente pour 1000 cm³ de liquide à 18 cm³, 52 de liqueur Normale (10 gr. d'asparagine étant saturés par 7 cm³, 50 de liqueur alcaline Normale, et 1 gr., 50 de $PO^4 KH^2$ par 11 cm³, 02 [1]). Si l'on

[1]) *Note sur l'asparagine.* – Solution stable dans l'eau : 2 p. 100 environ (la solution faite à chaud à une concentration plus élevée, – l'asparagine est soluble dans environ 1,9 parties à 100°, – laisse déposer des cristaux en se refroidissant).

L'asparagine, amide de l'acide aspartique, se comporte comme un acide faible ; sa solution est donc acide, mais la valeur de cette acidité varie selon l'indicateur employé. Ainsi 10c.c. d'une solution aqueuse d'asparagine à 2 p. 100, additionnés de

Tournesol..... virent avec 0 cc 60 de KOH N/10 (virage peu précis d'ailleurs).
Hélianthine ..... „ „ 0 cc 20 —
Phénolphtaléine ..... „ „ 1 cc 50 — (teinte rose pâle, ne passant au rouge vif qu'avec 3 cc, 7 de KOH N/10).

Au demeurant, tous ces virages ne sont pas nettement marqués. Ils étaient appréciés chaque fois par comparaison avec une même solution témoin. Comme avec les acides aminés, l'incertitude du virage est due à la neutralisation intramoléculaire du carboxyle par la fonction amine, engendrant sans doute une sorte de sel ammoniacal interne. Si on ajoute du formol, comme l'indiqua SHIFF, le groupement AzH^2 est détruit et remplacé par le groupement méthylénique $Az = CH^2$, c'est-à-dire que

détermine la réaction du milieu par la mesure de sa concentration en ions H, celle-ci, d'après la notation de SOERENSEN, est égale à pH=6,4 . Cette valeur est évidemment plus précise que celle fournie par l'acidimétrie, étant donnée surtout la présence de substances dites « tampons » (asparagine et phosphate) qui s'opposent à de brusques changements d'acidité ou d'alcalinité et par suite à de brusques changements de teinte de l'indicateur.

---

la neutralisation intramoléculaire du carboxyle cesse et l'asparagine devient alors facilement titrable acidimétriquement en présence de phtaléine, le virage étant poussé jusqu'au rouge vif (recommandation faite par SŒRENSEN qui précisa la technique). Dans ces conditions 10 cc. d'une solution aqueuse d'asparagine à 1 p. 100 additionnés de 10 c.c. de formol neutralisé virent au rouge avec 6 c.c., 6 de KOH N/10.

L'ébullition en présence des acides et des alcalis dédouble l'asparagine en ammoniaque et ac. aspartique :

$$COOH\text{-}CH^2\text{-}CHAzH^2\text{-}COAzH^2 + H^2O = COOH\text{-}CH^2\text{-}CHAzH^2\text{-}COOH + AzH^3$$

Cette hydrolyse se produit d'ailleurs déjà à froid avec une alcalinité peu élevée. Ainsi 50 c.c. de solution d'asparagine à 2 p. 100 placés dans une fiole conique de 200 c.c., puis additionnés de 1 c.c. de KOH N. (flacon 1) déterminent, à la température du laboratoire (16°) et déjà au bout de 48 heures, le virage au violet d'un papier de tournesol rouge suspendu au-dessus du liquide ; au bout de 3 jours le papier est devenu entièrement bleu.

Avec 1/2 c.c. de KOH N. (fl. 2), toutes choses égales d'ailleurs, le papier de tournesol est encore rouge au bout de 48 heures, mais il commence à devenir légèrement violacé au troisième jour, et le bleuissement va ensuite en s'accentuant.

Avec 1/4 c.c. de KOH N. (fl. 3), une légère teinte violacée n'apparait au bord inférieur que vers le quatrième jour.

Dans un flacon témoin non alcalinisé, le papier naturellement demeure rouge ; au reste les divers liquides étaient limpides et l'examen microscopique n'a décelé aucune infection.

De l'ammoniaque reste d'ailleurs dissous dans le liquide, et la quantité de SO^4H^2 N. nécessaire pour produire le virage au rose des flacons 1, 2 et 3, additionnés d'hélianthine, est supérieure à la quantité de KOH N. primitivement introduite, toutes corrections faites. – Le même essai effectué sur le flacon témoin aussitôt après addition de potasse n'accuse pas cette différence.

Le passage à l'autoclave à 115° pendant 20 minutes d'une solution d'asparagine à 2 p. 100, telle quelle, ou neutralisée avec KOH (à la phtaléine,) ou alcalinisée à 10 c.c. de KOH N. p. 1000, ou acidifiée à 10 et 25 c.c. de PO^4H^3 p. 1000, ne modifie pas sensiblement la réaction initiale (comparaison de virage avec témoin non passé à l'autoclave), que la solution ait été répartie en flacons hermétiquement clos ou simplement bouchés au coton. Il ne modifie pas non plus le titrage au formol.

Quant au *Phosphate de potassium*, il est préparé directement au moyen de liqueurs normales de KOH et de PO^4H^3 (cette dernière étant normale en prenant la phénolphtaléine comme indicateur, c'est-à-dire qu'elle renferme 49 gr. de PO^4H^3 p. 1000) : on a ainsi 11 c.c., 025 de KOH N. + 22 c.c., 05 de PO^4H^3 N. = 1 gr. 50 de PO^4KH^2 qui, dissous dans un litre d'eau, donne donc avec la phtaléine une acidité égale à 11 c.c., 025 de liqueur Normale.

Les milieux au bouillon de viande (glycériné-peptoné) qui sont d'un usage courant paraissent mieux convenir au développement microbien lorsqu'ils sont très légèrement alcalins ; c'est du moins l'avis des différents auteurs qui pour l'étude des microbes pathogènes emploient toujours des bouillons neutres ou faiblement alcalinisés, réservant les milieux acides pour l'étude des moisissures ou des levures. D'après Park et Williams, l'alcalinité favorable est obtenue en ajoutant au bouillon neutre 7 cm³ de solution Normale de soude par litre ; mais ils ne spécifient pas l'indicateur, or un bouillon neutre au tournesol est encore acide à la phtaléine.

Le Comité américain [1]) prescrit de neutraliser le bouillon en se servant de phtaléine et d'ajouter ensuite 15 cm³ de soude Normale par litre pour lui donner le degré d'alcalinité convenable, ou plus exactement de l'additionner d'une quantité de soude telle qu'après stérilisation il soit nécessaire d'employer 15 cm³ d'acide chlorhydrique Normal par 1000 cm³ pour le neutraliser.

Nicolle conseille d'ajouter autant de lessive de soude qu'il est nécessaire pour faire virer au rose la phtaléine, puis 10 cm³ de soude Normale par litre. D'autres bactériologistes alcalinisent seulement avec 5 cm³ de soude Normale.

Il semble que sur le bouillon peptoné glycériné classique, la zone de développement optimum du bacille tuberculeux humain soit voisine de pH = 7,1.

Au contraire avec les milieux minéraux synthétiques, il est généralement admis qu'ils donnent de meilleurs résultats lorsqu'ils sont acides. J'ai rappelé plus haut que Tiffeneau et Marie, étudiant les formules de Proskauer et Beck, ont indiqué comme acidité optima évaluée en soude, en présence de phtaléine, 0 gr., 50 à 0 gr., 80 par litre, soit 15 à 20 cm³ de liqueur Normale.

---

[1]) Comité de l'« American Public Health Association » qui en 1898 publia un rapport très documenté sur la préparation des milieux de culture et proposa un plan général d'étude des Bactéries, selon le vœu émis par les bactériologistes des Etats-Unis au Congrès de Montréal (1895). — La même année, en France, Grimbert publiait dans les « Archives de Parasitologie » un article sur l'unification des méthodes de culture et insistait à nouveau sur cette nécessité en 1903 en même temps qu'il exposait le plan d'une marche méthodique pour l'étude des fonctions bio-chimiques des Bactéries (Grimbert : Thèse Doctorat en méd. Paris 1903).

Bezançon, Philibert et Boudin, dont les milieux ont la même constitution saline, fixent l'acidité optima à 0 gr., 70 par litre, exprimée en acide phosphorique, soit 14 cm³, 30 d'acide phosphorique Normal (à 49 gr. par litre). — Le milieu de Sauton est fortement acide (31 cm³, 60 de liq. Normale par litre). — Mais par contre le milieu de Baudran est neutre et les milieux de Delille, Mayer, Schaeffer et Terroine sont légèrement alcalins (4 cm³ NaOH $\frac{N}{100}$ par litre) de même que certains milieux de Calmette, Massol et Breton (milieu avec succinimide par ex.). Les milieux utilisés par Frouin ne sont pas ou sont peu acides et j'ai mentionné déjà que cet auteur ayant fait des ensemencements sur un milieu à alcalinité croissante a vu que le bacille tuberculeux pouvait se développer encore, quoique mal, avec une alcalinité en soude équivalente à la concentration $\frac{N}{5}$, soit 200 cm³ de liqueur Normale par litre, ce qui est considérable. L'accord sur la réaction optima, quand il s'agit de milieux synthétiques, n'existe donc plus et il semble que le sens et la grandeur de cette réaction ne sauraient être fixes mais dépendent de la constitution même du milieu.

J'ai fait varier la réaction du milieu indiqué page 18, le rendant plus ou moins acide, neutre ou alcalin dans le but d'en établir la réaction optima pour le développement du bacille, et celà par addition de liqueur Normale de potasse ou d'acide phosphorique. Mais une imcompatibilité apparait. En effet un tel milieu alcalinisé et même neutre n'est pas stable : après passage à l'autoclave (20 min. à 115°) on constate au fond des ballons, le liquide étant limpide, un dépôt sablé assez abondant en milieu alcalin, léger en milieu neutre, — dépôt également obtenu à froid mais en quantité moindre au bout de quelques heures (d'ailleurs le passage à l'autoclave ne modifie en rien la réaction).

Ce dépôt est constitué par du phosphate de magnésium insoluble: dans le milieu alcalin, c'est-à-dire en présence de phosphate tripotassique, le sulfate de magnésium donne un précipité blanc amorphe de phosphate trimagnésique, $(PO^4)^2Mg^3$, qui n'est soluble que dans 5.000 parties d'eau. En milieu neutre à la phtaléine, c'est-à-dire en présence de phosphate bipotassique, le sulfate de magnésium donne un phosphate monomagnésique, PO^4MgH, qui, à froid, se dépose en aiguilles

hexagonales solubles seulement dans 320 parties d'eau ; la solution chauffée se trouble et laisse déposer à l'ébullition du phosphate trimagnésique tandis qu'il reste un sel diacide en solution ($4\ PO^4MgH = (PO^4)^2Mg^3 + (PO^4)^2MgH^4$) [1].

A cause de cette précipitation et indépendamment de la réaction, on pourrait reprocher aux différents milieux de n'être pas comparables, les alcalins se trouvant moins riches en substances dissoutes. L'addition de 1 gr. d'acide citrique par litre, qui donne du citrate de potassium lorsqu'on neutralise ou alcalinise, empêche cette précipitation. La formule du milieu devient alors :

Phosphate monopotassique .	1 gr.,50	
Sulfate de magnésium . .	1 gr.	
Acide citrique	1 gr.	(que neutralise 0 gr.800 de KOH, soit 14cm³,28 de KOH N.)
Asparagine	10 gr.	
Glycérine	40 gr.	
Eau dist. Q. S. P. . .	1000 cm³	

J'ai pu ainsi expérimenter des milieux soit neutre, — soit d'une alcalinité égale à 5 cm³, 15 cm³ et 30 cm³ de liqueur Normale par litre, — soit d'une acidité égale à 10 cm³, 15 cm³, 20 cm³ et 30 cm³ de liqueur Normale par litre, la phtaléine servant d'indicateur dans tous les cas.

Pour chacun de ces différents milieux j'ensemençai 4 ballons : l'ensemencement fut fait le même jour avec une öse (donnant un fragment de 6 à 8 millim. carrés environ) d'un même voile développé sur bouillon peptoné glycériné.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau I.

---

[1]) Il n'y a pas, dans le dépôt, de prismes quadratiques de phosphate ammoniaco-magnésien dû à de l'ammoniaque provenant de l'hydrolyse de l'asparagine. D'ailleurs le même dépôt se produit en l'absence de l'asparagine.

TABLEAU I.

Influence de la réaction du milieu sur le développement de la culture.

	Réaction du milieu (au départ)	Marche du développement (apparition du voile)	Aspect de la culture 22 jours après l'ensemencement	Poids sec moyen de la culture par ballon de 50 cm³ 22 jours après l'ensemencement
ALCALINE	à 30 cm³ Liq. N. ⁰/₀₀ (pH=11)	Le développement ne commence que vers le 10ᵉ jour.	Pellicule mince, sectionnée en ilôts, couvrant la surface du liquide.	88 mgr.
ALCALINE	à 15 cm³	Au bout de 5 jours, voile très ténu, d'une surface égale à 2 ou 3 cm²; — au bout de 13 jours il couvre la moitié environ de la surface du liquide.	Pellicule mince, plus homogène que la précédente, couvrant la surface du liquide.	165 »
ALCALINE	à 5 cm³	Au bout de 5 jours, voile ténu couvrant ¹/₄ de la surface du liquide; - au bout de 13 jours il la couvre presque entièrement.	Pellicule, un peu gaufrée, mais mince, couvrant toute la surface, et montant même légèrement le long des parois du ballon.	213 »
NEUTRE		Développement sensiblement semblable au précédent.	Aspect peu différent du précédent.	275 »
ACIDE	à 10 cm³ Liq. N. ⁰/₀₀	Au bout de 5 jours, voile très ténu, ajouré, couvrant les ²/₃ environ de la surface du liquide.	Voile peu épais, continu, plissé, s'élevant le long des parois.	320 »
ACIDE	à 15 cm³ (pH=6,6)	Au bout de 5 jours, pellicule réticulée couvrant toute la surface du liquide et montant même le long des parois du ballon; - au bout de 13 jours, le voile s'est épaissi et gaufré.	Voile épaissi, gaufré, s'élevant le long des parois.	390 »
ACIDE	à 20 cm³	Au bout de 5 jours, mince pellicule, couvrant la totalité du liquide.	Aspect peu différent du précédent.	338 »
ACIDE	à 30 cm³ (pH voisin de 4,8)	Au bout de 8 jours, une très fine pellicule couvre à peine la moitié de la surface du liquide.	Voile couvrant toute la surface mais à l'état de pellicule ténue lisse.	93 »

L'addition d'acide phosphorique ou de potasse nécessaires pour modifier la réaction détermine les variations suivantes dans la teneur du milieu en phosphore et en potassium :

		P. $^0/_{00}$	K. $^0/_{00}$*)
Milieux acides	Alcalinité = 30 cm³ de liq. N. $^0/_{00}$ . . .	0 gr., 3409	2 gr., 8793
	Alcalinité = 30 cm³ de liq. N. $^0/_{00}$ . . .	0 gr., 3409	2 gr., 2889
	Alcalinité = 5 cm³ de liq. N. $^0/_{00}$ . . .	0 gr., 3409	1 gr., 8989
Milieu neutre		0 gr., 3409	1 gr., 7039
Milieux alcalins	Acidité = 10 cm³ de liq. N. $^0/_{00}$	0 gr., 3409	1 gr., 3139
	Acidité = 15 cm³ de liq. N. $^0/_{00}$	0 gr., 3409	1 gr., 2749
	Acidité = 18 cm³ de liq. N. $^0/_{00}$ (milieu normal)	0 gr., 4494	1 gr., 2749
	Acidité = 20 cm³ de liq. N. $^0/_{00}$	0 gr., 5089	1 gr., 2749
	Acidité = 30 cm³ de liq. N. $^0/_{00}$	0 gr., 6354	1 gr., 2749

*) Y compris la potasse uniformément ajoutée pour neutraliser l'asparagine et l'acide citrique, et qui représente 0 gr.,846 de potassium par litre (10 gr. d'asparagine et 1 gr. d'ac. citrique par litre étant respectivement neutralisés par 7 cm³, 5 et 14 cm³, 2 de KOH N, en présence de phtaléine).

On ne peut attribuer l'accroissement de la culture à une plus grande richesse du milieu en phosphore, puisque précisément sur les deux milieux qui en contiennent le plus, c'est-à-dire sur ceux dont l'acidité correspond à 20 cm³ et à 30 cm³ de liqueur Normale par litre, le poids de la récolte diminue. — Par contre à partir de la neutralité et à mesure que l'alcalinité augmente, la teneur du milieu en potassium s'accroît : la réduction parallèle de la récolte ne serait-elle pas due à un excès de ce métal ? Pour m'en rendre compte, j'ai laissé constante la quantité de phosphate monopotassique (1 gr., 50 par litre) et j'ai remplacé les doses croissantes de potasse, ajoutées pour modifier la réaction, par des quantités équivalentes de soude.

Cette base est en effet indifférente au bacille tuberculeux et nullement toxique, du moins dans de larges limites, puisqu'elle n'entrave pas son développement aux doses de 4 et 6 gr. par litre (Frouin). Les résultats furent sensiblement identiques. En présence de fortes alcalinités il y a hydrolyse rapide de l'asparagine avec dégagement d'ammoniaque en quantité toxique sans doute pour le bacille.

Ainsi avec le milieu chimiquement défini que j'ai employé, la réaction acide paraît nettement favorable au développement du bacille tuberculeux et l'acidité optima de départ semble avoir une valeur comprise entre 15 cm³ et 18 cm³ de liqueur Normale par litre, ce qui correspond à une concentration en ions H variant de pH = 6,6 à pH = 6,4.

Si l'on supprime l'acide citrique (sa présence n'étant pas nécessaire en milieu acide puisqu'il n'y a pas, dans ce cas, précipitation de phosphate de magnésium) on constate la même valeur comme acidité optima, mais la récolte moyenne est un peu inférieure.

La réaction alcaline correspondant à 30 cm³ de liqueur Normale par litre est, sinon empêchante, du moins très retardatrice ; je suis loin pourtant de l'alcalinité qui, selon Frouin, serait tolérée par le bacille. Et d'autre part j'ai obtenu quand même dans ces conditions un développement supérieur à celui observé par Besançon, Philibert et Boudin qui, sur leur milieu alcalinisé avec 1 gr. de potasse par litre (soit 17 cm³, 8 de liq. Normale) n'obtinrent un voile couvrant la surface du liquide qu'au bout de 3 mois ; d'autre part encore le milieu de Borrel ne donne aucune culture avec une alcalinité correspondant à pH = 7,7, — tant il est vrai que les deux limites d'acidité et d'alcalinité entre lesquelles le bacille est susceptible de se développer dépendent de plusieurs facteurs, et que la composition même du milieu entre en très grande ligne de compte.

3.
VALEUR NUTRITIVE COMPARATIVE DE DIVERS COMPOSES AZOTÉS.

J'ai essayé comme source d'azote pour le bacille tuberculeux outre l'asparagine, le milieu par ailleurs demeurant le

même, quelques autres corps azotés bien définis organiques ou minéraux, notamment : le succinate d'ammonium, le citrate d'ammonium, le tartrate d'ammonium, le sulfate d'ammonium, l'azotate d'ammonium, et l'azotate de potassium.

Les quantités de ces corps à dissoudre dans un litre de liquide nutritif étaient calculées pour un égal apport d'azote, en prenant comme apport étalon celui fourni par 10 gr. d'asparagine.

L'asparagine cristallisant avec 1 molécule d'eau a comme poids moléculaire 150 renfermant 28 gr. d'azote ; 10 gr. d'asparagine fournissent donc 1 gr., 85 d'azote.

Ce même poids d'azote sera donné par :

10 gr., 10 de succinate d'ammonium neutre (poids moléc. : 152)
10 gr., 76 de citrate » » (» » : 243)
12 gr., 22 de tartrate » » (» » : 184)
8 gr., 76 de sulfate » » (» » : 132)
5 gr., 31 d'azotate » (» » : 80)
13 gr., 42 d'azotate de potassium (» » : 101)

Comme dans les essais comparatifs précédents ces divers milieux ont été ensemencés simultanément (4 ballons pour chacun d'eux) avec une semblable parcelle d'un même voile développé sur bouillon peptoné glycérine et âgé de 10 jours.

Le Tableau II contient les résultats obtenus.

On voit que, dans le milieu considéré, l'azote en combinaison minérale est médiocrement ou n'est pas assimilable pour le bacille tuberculeux : le sulfate d'ammonium est un mauvais aliment azoté et les azotates apparaissent même comme toxiques à doses un peu élevées : en effet si à des cultures en voie de développement sur du liquide nutritif avec asparagine on ajoute aseptiquement de l'azotate d'ammonium ou de l'azotate de potassium (5 cm^3 d'une solution à 20% dans un ballon renfermant 50 cm^3 de liquide nutritif) le développement s'arrête ; si l'on prend alors une parcelle du voile qui a été ainsi en contact avec le liquide additionné d'azotate et qu'on l'ensemence sur un milieu reconnu favorable elle ne se développe plus.

Quant aux résultats donnés par les sels ammoniacaux à acides organiques, citrate, tartrate et succinate d'ammonium, ils sont faibles relativement à ceux que donne l'asparagine.

TABLEAU II.

Influence de la nature de l'aliment azoté sur le développement de la culture.

	Nature de l'aliment azoté	Marche du développement	Aspect de la culture 25 jours après l'ensemencement	Poids sec moyen de la culture par ballon de 50 cm³ 25 jours après l'ensemencement
Azote en combinaison organique	Asparagine (10 gr. °/₀₀)	Au bout de 6 jours, pellicule couvrant toute la surface du liquide et commençant même à grimper le long des parois du ballon.	Voile épais, plissé, croûteux, de couleur jaunâtre, couvrant toute la surface du liquide (qui est jaune pâle) et grimpant le long des parois.	418 mgr.
	Succinate d'Ammonium (10 gr. 76 °/₀₀)	Le voile se développe plus lentement qu'avec l'asparagine; au bout de 8 à 9 jours seulement la pellicule atteint les bords du ballon.	Voile peu épais, mais très plissé, un peu jaunâtre, couvrant toute la surface du liquide (qui a pris aussi une légère teinte jaune) et grimpant le long des parois,	245 »
	Citrate d'Ammonium (10 gr. 76 °/₀₀)	Développement plus tardif encore : le voile cultural ne couvre la surface du liquide que vers le 12e ou 13e jour.	Comme avec le Succinate, mais moins plissé et ne grimpant que légèrement le long des parois.	210 »
	Tartrate d'Ammonium (12 gr. 22 °/₀₀)	Développement sensiblement semblable à celui du milieu avec Citrate.	Le voile est homogène, un peu plissé, mais ténu, transparent, également jaunâtre comme le liquide.	195 »
Azote en combinaison minérale	Sulfate d'Ammonium (8 gr. 76 °/₀₀)	Développement tardif et très lent.	Légère pellicule, lisse, très mince, fragmentée, couvrant à peine les $^2/_3$ de la surface du liquide qui est demeuré incolore.	96 »
	Azotate d'Ammonium (5 gr. 31 °/₀₀)	—	Développement insignifiant	—
	Azotate de potassium (13 gr. 42 °/₀₀	—	Développement insignifiant.	—

L'utilisation nettement meilleure de l'azote apporté par l'asparagine est due vraisemblablement à ce que cet élément s'y trouve dans un groupement aminé.

Ces résultats se rapprochent de ceux de CALMETTE, MASSOL et BRETON ; par contre le succinate d'ammonium (4 gr., 60 par litre) avait paru à BEZANÇON, PHILIBERT et BOUDIN assurer une meilleure récolte lorsqu'on le substitue à l'asparagine (4 gr. par. litre) dans le milieu de PROSKAUER et BECK ; mais cette observation n'a pas été confirmée.

J'ai essayé également comme aliment azoté l'acide aspartique et l'urée.

Etant donnée la faible solubilité de l'acide aspartique [1]) dans l'eau (1 gr. dans 250 gr. d'eau à 15°), je n'ai pu en mettre que 4 gr. par litre, ce qui représente 0 gr., 42 seulement d'azote ; mais le développement n'en est pas moins rapide et la culture abondante. Vingt-cinq jours après l'ensemencement, la récolte moyenne par ballon (moyenne de 3 ballons) fut de 423 mgr. en bacilles secs, c'est-à-dire qu'elle fut semblable à celle obtenue sur le milieu à l'asparagine (10 gr. d'asparagine par litre, représentant 1 gr., 86 d'Az.). L'ensemencement avait été fait avec des bacilles humains. — D'autres essais comparatifs faits dans les mêmes conditions mais avec des bacilles bovins furent même en faveur de l'acide aspartique qui donna 370 mgr. de bacilles secs par ballon en 25 jours, tandis que la récolte sur le milieu à l'asparagine n'atteignit que 280 mgr.

Mais pour que la comparaison entre les utilisations des deux aliments azotés fût rigoureuse, il convenait d'abaisser la quantité d'asparagine de 10 gr. à 2 gr., 25 par litre, afin d'avoir de part et d'autre le même apport d'azote (0 gr., 42).

---

[1]) L'acide aspartique ne présente pas vis-à-vis des divers indicateurs colorés les grandes différences de réaction que montre l'asparagine. Ainsi 10 cm³ d'une solution aqueuse d'ac. aspartique à 1 p. 250, additionnés de phtaléine.... virent au rose pâle avec 2 cm³, 85 de KOH $\frac{N}{10}$,
d'hélianthine... » au jaune » 2 cm³, 6 — ,
de tournesol.... » au bleu » 2 cm³, 85 — .

Après passage à l'autoclave (10 min. à 115°), ces valeurs diminuent et deviennent respectivement : 2,6 (phtaléine) — 2,3 (hélianthine) — 2,75 (tournesol).

Le titrage au formol exige, pour 10 cm³ d'une semblable solution à 1/250, 5 cm³, 9 de KOH $\frac{N}{10}$ (technique de SOERENSEN).

La récolte moyenne en 25 jours sur le milieu à l'asparagine tombe alors à 270 mgr. de bacilles secs par ballon, (ensemencement fait avec le même bacille humain que dans la première expérience).

La valeur alimentaire du groupement carboxyle-aminé, COOH — $CHAzH^2$, commun à tous les acides aminés, apparaît donc nettement : les 42 centigr. d'azote qu'apportent 4 gr. d'acide aspartique sont en totalité inclus dans ce groupement ; au contraire avec l'asparagine la moitié seulement de l'azote, soit 21 centigr., s'y trouve incluse.

C'est ce que Delille, Mayer, Schaeffer et Terroine avaient mis en évidence en employant pour la nutrition azotée du bacille un acide aminé à chaîne droite, le glycocolle (4 gr. par litre, représentant 0 gr., 75 d'Az.) et un acide diaminé, l'arginine (2 gr. par litre, représentant 0 gr., 64 d'Az.). Leur milieu renfermait ainsi au total 1 gr., 39 d'azote et donnait des cultures extrêmement rapides et abondantes, puisqu'elles atteignaient en 8 jours le développement qui demande 3 semaines sur bouillon peptoné.

Sans manifester certes cette rapidité de développement, la culture sur milieu renfermant seulement de l'acide aspartique, c'est-à-dire un acide aminé, est déjà très satisfaisante ; mais l'arginine ajoutée, comme l'histidine d'ailleurs, active considérablement la végétation et Delille, Mayer, Schaeffer et Terroine avaient reconnu que certains principes extractifs du bouillon, en particulier la carnosine et la créatine, agissaient de même. Or les travaux récents de Mauthuer, puis de Baumann et Thornsten-Ingwaldsen sur la constitution de la carnosine ont établi qu'elle serait la β alanylhistidine. Bien qu'on ait cherché dans l'arginine sans succès jusqu'à présent la substance mère de la créatine, il est permis de penser que celle-ci doit son action favorisante à ce qu'elle contient vraisemblablement, comme l'arginine elle-même, le noyau de la guanidine [1]). Ce noyau, ainsi que le noyau imidazolique de l'histidine, joue un rôle capital dans le métabo-

[1]) La désamination de l'arginine avec chute d'un maillon carboné peut donner l'acide guanidine-butyrique, composé que la β oxydation conduirait ensuite à l'acide guanidine-acétique. Or cet acide donné au lapin est méthylé dans l'organisme, c'est-à-dire transformé en créatine (Lambling).

lisme des animaux supérieurs, métabolisme qui exige l'un au moins de ces deux corps. — Si efficaces qu'ils se montrent également dans le développement microbien, il semblerait néanmoins que ni l'un ni l'autre ne soient indispensables, puisque le bacille tuberculeux se développe très bien sur un milieu qui en est dépourvu et contenant seulement de l'acide aspartique.

Mais peut-être le bacille peut-il faire la synthèse du noyau de l'imidazol aux dépens des substances qui lui sont données : ainsi Bierry et Portier ayant ensemencé des symbiotes isolées des testicules du chien sur un milieu ne renfermant comme aliments azotés que de l'asparagine et un nitrate, et comme autres éléments du saccharose et un β glycérophosphate, ont reconnu que le liquide après 30 à 50 jours de culture à 37° renfermait des substances donnant fortement la réaction de Pauly (coloration rouge avec l'acide diazobenzènesulfonique en présence d'alcali). J'ai obtenu de même cette réaction sur mon milieu à l'asparagine ou à l'acide aspartique après 25 jours de culture. Toutefois la réaction de Millon est également positive, ce qui prouve la présence de la tyrosine : or celle-ci donne aussi la réaction de Pauly.

L'urée avait été signalée par Rappin comme exerçant une action empêchante sur les cultures en bouillon du bacille tuberculeux, action qui se manifestait déjà aux doses de 0 gr., 30 à 0 gr., 50 pour 100 cm³; d'autres part Rappin vit que des injections de solutions d'urée à des animaux tuberculeux amenaient une survie parfois très marquée. — E. Levy, Fr. Blumenthal et A. Marxer constatèrent de même que des bacilles ayant séjourné 2 jours dans une solution d'urée à 25% (5 mgr. de bacilles dans 4 cm³ de solution) étaient inoffensifs pour le cobaye.

Ajoutée à la dose de 4 gr. par litre à mon milieu chimiquement défini contenant de l'asparagine, l'urée ne s'est pas montrée toxique et 30 jours après l'ensemencement la récolte moyenne par ballon fut de 360 mgr. en bacilles secs (moyenne de 3 ballons). Toutefois le développement est moins rapide que sur le milieu témoin sans urée. Le liquide, acide au moment de l'ensemencement (acidité égale à 18 cm³ de liqueur Normale

par litre), l'était encore légèrement au 30e jour (acidité égale à 8 cm³ de liqueur Normale par litre).

Si l'on supprime l'asparagine et laisse l'urée comme seul aliment azoté (4 gr. d'urée par litre représentent la même quantité d'azote que 10 gr. d'asparagine), le bacille se développe mais lentement, le voile n'est pas homogène et en 30 jours la récolte n'atteint que 280 mgr. en bacilles secs (moyenne de 3 ballons) ; au reste, le milieu est demeuré acide comme précédemment.

En milieu neutre et a fortiori alcalin, avec cette même dose d'urée, la culture ne se développe pas : il se produit en effet de l'ammoniaque, toxique pour le bacille.

Si l'on porte la quantité d'urée à 8 gr. par litre, il n'y a plus aucun développement, même en milieu acide.

Pour éviter toute décomposition, l'urée n'était pas dissoute dans le liquide nutritif avant le passage à l'autoclave, mais ajoutée ensuite aseptiquement.

4.

VALEUR NUTRITIVE COMPARATIVE DE DIVERS HYDRATES DE CARBONE.

(Essais de remplacement de la glycérine.)

L. Vaillant (1906) a bien cultivé des bacilles tuberculeux sur du bouillon dans lequel la glycérine était remplacée par divers sucres (glucose, lévulose, saccharose, lactose) et a même obtenu avec le glucose un notable rendement, supérieur à celui du bouillon glycériné.

Massol et Breton (1921) ont de même vu que dans des tubes de culture sur pomme de terre le glucose et le lévulose peuvent remplacer la glycérine.

Mais il s'agit là d'essais faits avec des milieux complexes, pomme de terre et bouillon de viande.

Avec les milieux définis purement chimiques les différents auteurs ont reconnu que pour le bacille tuberculeux la glycérine était l'aliment hydrocarboné de choix, nécessaire presque, et d'ailleurs suffisant. Sa suppression et son remplacement par divers hydrates de carbone leur ont donné en effet des résultats nuls ou médiocres. D'autre part l'addition de divers

sucres, alcools polyatomiques ou acides-alcools, n'a pas paru dans l'ensemble d'un grand appoint. « La présence de la glycérine est indispensable, écrit SAUTON, et j'ai essayé sans succès de la remplacer par le glycol, la mannite, la dulcite, l'érythrite ou par divers sucres » ; — et A. DELILLE, MAYER, SCHAEFFER et TERROINE : « les essais ayant pour but de supprimer la glycérine dont la présence est si gênante pour toute tentative de séparation ultérieure des substances chimiques définies ont échoué ». PROSKAUER et BECK n'avaient de même obtenu aucun développement microbien appréciable en la supprimant dans les nombreux milieux qu'ils expérimentèrent. Parfois ils lui adjoignirent divers sucres mais en pareil cas ceux-ci, d'après TIFFENEAU et MARIE, ne paraissent pas intervenir et sont retrouvés en fin de culture presque intégralement.

La glycérine déclarée indispensable se trouve donc conservée dans toutes les formules [1]) et d'ailleurs au point de vue pratique sa présence est justifiée par la fabrication ultérieure de la tuberculine dont elle assure la conservation.

Est-ce à dire que la glycérine soit vraiment l'hydrate de carbone indispensable dans les milieux synthétiques définis ?

Dans le milieu que j'ai précédemment indiqué (page 24), — la quantité d'acide citrique par litre ayant toutefois été élevée à 2 grammes, neutralisés ensuite par de la potasse —, j'ai cherché à lui substituer divers autres corps hydrocarbonés Je les énumère en suivant leur ordre de complexité : sucres ne possédant que des fonctions alcooliques (alcools polyatomiques) ; sucres possédant une fonction aldéhyde ou cétone (sucres réducteurs non hydrolysables) ; sucres résultant de la soudure avec élimination d'eau de 2 molécules de sucres à fonction aldéhydique ou cétonique (sucres hydrolysables — hexobioses) ; polysaccharides ; enfin des corps renfermant outre la fonction alcool des fonctions acides (sels organiques).

Chaque fois des milieux glycérinés témoins (sans sucre) étaient ensemencés simultanément. Sur tous ces milieux l'ensemencement fut fait avec un fragment (de 6 à 8 millim. car-

---

[1]) Je ne parle pas des milieux de BAUDRAN dans lesquels la glycérine en nature est remplacée par des quantités convenables de glycérophosphates qui ont donné, dit cet auteur, un bon développement et des cultures abondantes.

rés environ) d'un même voile ou de voiles semblables ayant le même âge et s'étant développés dans les mêmes conditions sur le même liquide nutritif (voile de 10 jours sur bouillon peptoné glycériné).

Alcools polyatomiques.

Mes recherches ont porté sur un alcool tétratomique, l'érythrite. et sur trois hexites, la dulcite, la mannite et la sorbite ; le milieu demeurait par ailleurs identique au milieu glycériné sauf qu'il avait seulement l'acidité propre à l'asparagine, c'est-à-dire une acidité correspondant à 7 cm³, 50 de liqueur Normale par litre en présence de phtaléine, ou pH = 6,8. — L'ensemencement fut fait comparativement avec des bacilles humains et des bacilles bovins.

Erythrite. —

La glycérine est remplacée par un poids égal d'érythrite. Quelle que soit l'origine des bacilles, humaine ou bovine, il ne se produit qu'un très léger développement atteignant en moyenne après 30 jours d'étuve l'étendue d'une pièce de 2 francs. — D'autre part le liquide est devenu alcalin à la phtaléine (alcalinité égale à 6 cm³, 8 de liqueur Normale par litre).

Dulcite. —

A cause de la faible solubilité de la dulcite dans l'eau, les 4 gr. de glycérine contenus dans 100 cm³ de liquide nutritif sont remplacés par 2 gr., 60 seulement de dulcite. — Résultat semblable à celui donné par l'érythrite. — L'alcalinité acquise par le liquide après 30 jours d'étuve est égale à 5 cm³ de liqueur Normale par litre.

Mannite. —

La glycérine est remplacée par un poids égal de mannite. — Résultat identique aux précédents.

Sorbite. —

La glycérine est remplacée par un poids en peu moindre de sorbite : 3 gr. au lieu de 4 gr. dans 100 cm³ de liquide nutritif. — Résultat identique aux précédents.

Ainsi les tétrites et les hexites ne paraissent pas être des aliments hydrocarbonés utilisables, du moins dans les conditions d'expérience.

Pentoses [1])

Les sucres en C^5 ne semblent pas mieux convenir. Toutefois mes essais ne furent faits qu'avec l'arabinose remplaçant en poids égal (4 gr. p. 100 cm^3) la glycérine. Comme dans les essais avec les alcools polyatomiques, le milieu ensemencé n'avait que l'acidité due à l'asparagine et les ensemencements furent pratiqués avec des bacilles bovins et des bacilles humains. Mêmes résultats négatifs : le développement ne dépasse pas au total l'étendue d'une pièce de 2 francs. — Le liquide après 30 jours d'étuve avait conservé son acidité initiale.

Hexoses.

Glucose. —

La glycérine est remplacée par un poids égal de glucose anhydre, qui apporte sensiblement la même quantité de carbone, soit 16 grammes. D'autre part j'ai expérimenté en milieu acide (acidité correspondant à 18 cm^3 de liq. Normale par litre), en milieu neutre et en milieu alcalin (alcalinité correspondant à 5 cm^3 de liq. Normale par litre, soit pH = 8).

Le développement ne parait pas très influencé par la réaction du milieu, dans les limites d'acidité et d'alcalinité que je viens d'indiquer. Si parfois la culture en milieu acide a accusé un léger retard dans son développement par rapport aux cultures sur les milieux neutre ou alcalin, ce fait n'était pas constant et pouvait être dû à l'ensemencement. — Dans tous les cas, la prolifération cellulaire est beaucoup plus rapide que sur le milieu glycériné témoin correspondant : Dès le 5e ou le 6e jour, un voile épais, mamelonné, couvre toute la surface du liquide et commence à grimper le long des parois des ballons ; au 20e jour, il est de couleur jaunâtre, très épais, compact et gaufré, plongeant légèrement dans le liquide. Au-delà, il montre une tendance à se fragmenter, tendance qui, d'une façon générale, se manifeste surtout sur les milieux alcalins ; il s'immerge alors facilement par lambeaux, et souvent au bout de 25 jours il est en totalité tombé au fond des ballons, tandis qu'un léger voile parfois se reforme.

Les très nombreux ensemencements que j'ai faits m'ont donné en 20 jours de culture un poids de bacilles secs variant

[1]) La stérilisation des milieux sucrés fut faite à la vapeur fluente.

de 470 à 600 mgr. par ballon de 50 cm³ de liquide. En général ce fut sur milieu acide que la récolte fut la plus abondante.

Un ensemencement pratiqué avec une parcelle de voile prélevée non plus sur du bouillon peptoné glycériné mais sur un milieu glucosé, c'est-à-dire avec des bacilles déjà adaptés, donne de semblables résultats. (J'ai fait ainsi sur milieu au glucose trois réensemencements successifs.) Le milieu à la glycérine ensemencé simultanément donne au bout de 20 jours un voile peu épais, un peu plissé, couvrant toute la surface du liquide et grimpant légèrement le long des parois du ballon. Il est jaunâtre mais plus pâle que celui des milieux glucosés. Son poids sec moyen est de 380 mgr.

Enfin les cultures en milieu glucosé dégagent une odeur très aromatique, analogue à celle qui se développe en milieu glycériné.

J'ai dit que ces milieux contiennent 2 gr. d'acide citrique par litre. Alors que la présence de cet acide ne semble pas influer beaucoup sur le développement de la culture en milieu glycériné, il apparait comme utile en milieu glucosé. Il y a dans son action comme un phénomène d'entraînement ; il facilite en quelque sorte l'attaque du glucose. En effet si on le supprime, la culture se développe certes, donnant un voile épais et homogène, mais elle se développe lentement : elle ne recouvre environ que la demi-surface du liquide des ballons alors que dans les ballons témoins contenant de l'acide citrique le voile grimpe déjà le long des parois. (Ces derniers essais, sans acide citrique, ont été faits uniquement en milieu acide puisque, en l'absence d'acide citrique, les milieux neutralisés et a fortiori alcalinisés laissent précipiter du phosphate de magnésium.) [1])

Lévulose. —

Des essais semblables faits avec le lévulose dans les mêmes conditions ont donné des récoltes nettement inférieures. Ainsi,

[1]) Ces recherches avaient été faites en 1913—1914. Récemment alors que mon travail était prêt pour l'impression, A. FROUIN, qui ignorait mes expériences fit également des essais de culture sur milieu simple et chimiquement défini sensiblement semblable au mien, dans lequel la glycérine était remplacée par du glucose (15 gr. par litre) avec addition de mannite. Il obtint en 1 mois avec des bacilles humains (race Test de l'Institut Pasteur) un poids sec de récolte 2 *fois moindre que sur le milieu glycériné* (50 gr. de glycérine par litre) et 3 fois moindre que sur le milieu glycériné et glucosé (5 gr. de glucose par litre).

au bout de 20 jours, les cultures n'avaient qu'un poids sec moyen de 35 mgr. par ballon. L'origine de la semence ne paraît pas avoir d'influence et j'ai constaté un aussi médiocre développement en me servant pour l'ensemencement d'une culture sur milieu glucosé ou d'une culture sur bouillon peptoné glycériné.

Galactose. —

Avec le galactose mis à la place de la glycérine et en quantité également équivalente, il n'y a plus de développement ou le développement est insignifiant.

Cette différence d'utilisation par le bacille de trois sucres isomères, dont deux aldohexoses droites (glucose et galactose) et une cétohexose gauche (lévulose), n'a rien de surprenant depuis les mémorables études de Pasteur qui révélèrent comment le caractère nutritif d'un tartrate pour tel *Penicillium* peut être en relation avec sa dissymétrie moléculaire. Grimbert constata que le lévulose offrait également au bacille orthobutylique une résistance plus grande que le glucose ; Gayon et Dubourg signalèrent l'inverse pour le *Saccharomyces exiguus*. Plus récemment les recherches de G. Bertrand sur la bactérie du sorbose ont mis en évidence un éclectisme plus exclusif encore de la part de ce microorganisme : parmi les alcools polyatomiques, il fait un choix, n'attaquant dans leur molécule qu'un groupement alcoolique secondaire CHOH qu'il transforme en CO, c'est-à-dire en cétone. De plus, pour que ce chaînon soit attaqué, il faut que son oxydrile OH ne soit pas à côté de l'atome H du chaînon voisin CHOH ; enfin le groupement alcoolique secondaire attaqué est toujours voisin de l'un des groupements alcooliques primaires qui terminent la chaîne, au moins jusqu'aux termes en C^7. Non moins éclectique paraît être le bacille tuberculeux, — et de même que dans l'utilisation des amines comme source d'azote la structure de la chaîne qui porte la fonction aminée a une influence, de même la constitution stéréochimique des sucres joue un rôle important dans leur valeur nutritive puisque c'est d'elle seule que dépend la possibilité de l'attaque par le bacille.

Hexobioses.

Saccharose. —

Sur le même milieu, mais dans lequel le saccharose (40 gr. par litre) remplace la glycérine, le bacille ne se développe pas ou se développe très peu. Un mois et demi après l'ensemencement il n'y a que quelques rares fragments d'une pellicule très ténue flottant sur le liquide.

Les essais furent faits dans des conditions spéciales : naturellement on ne saurait opérer en milieu acide puisque le saccharose donne dans ce cas du sucre interverti après passage à l'autoclave, et même la seule acidité, bien faible pourtant, de l'asparagine suffit à déterminer l'interversion. Mais, même en milieu neutre (ainsi, une simple solution de saccharose dans de l'eau distillée) ou légèrement alcalin, le saccharose s'intervertit partiellement après passage à 115° quelques minutes. Pour les essais avec le saccharose j'ai donc ajouté aseptiquement au milieu de culture neutre, après son passage à l'autoclave et au moment de l'ensemencement, une quantité suffisante d'une solution de sucre faite à froid dans de l'eau distillée stérile.

Lactose. —

Même résultat négatif ou quasi négatif avec le lactose, dans les mêmes conditions d'expérience.

Maltose. —

Le maltose, employé de même, ne paraît pas être beaucoup mieux utilisé : un mois et demi après l'ensemencement, on ne constate à la surface du liquide que quelques petits et rares îlots pelliculaires, très minces et transparents.

Polysaccharides.

Amidon. —

Ce polysaccharide a été incorporé au milieu neutre (à la phtaléine) en remplacement de la glycérine, à la dose de 20 gr. par litre ; il constitue ainsi un empois mobile, mais laiteux, opaque, et qui demeure tel après passage à l'autoclave (15 minutes à 110°). Sur ce milieu j'ai obtenu une fois un développement microbien très lent, mais appréciable, cependant que l'empois s'était partiellement fluidifié et éclairci. Un ballon témoin non ensemencé et laissé à l'étuve dans les mêmes conditions avait conservé sa consistance initiale.

Renouvelé ultérieurement et à diverses reprises, avec d'autres races, cet essai n'eut pas le même succès : les cultures, après un commencement de développement, s'arrêtent, que la semence provienne d'un voile développé sur bouillon glycériné ou d'une culture sur milieu glucosé.

Bien que je n'eusse pas constaté d'infection, la réussite de ma première expérience était due sans doute à une hydrolyse de l'amidon étrangère au bacille tuberculeux.

Inuline. —

Employée comme aliment carboné à la place de la glycérine (à la dose de 20 gr. par litre), l'inuline n'est pas mieux utilisée que l'amidon par le bacille tuberculeux.

Dextrine. —

La dextrine dans les mêmes conditions (à la dose de 40 gr. par litre) ne se montre pas davantage alimentaire.

Sels organiques.

Citrate de potassium. —

Au cours de mes recherches j'avais reconnu l'action nettement favorable exercée par l'acide citrique à l'état de citrate de potassium, même lorsque sa présence n'est pas nécessaire pour empêcher une précipation. — Dans l'étude des multiples milieux essayés par Proskauer et Beck, il apparaît aussi que la présence de l'acide citrique (sous forme de citrate de magnésium), toutes autres conditions étant identiques, favorise le développement. — Mais peut-il être un aliment suffisant ?

Si l'on supprime dans le milieu nutritif tout alcool polyatomique ou sucre et qu'on laisse l'acide citrique seul (2 gr. par litre) à l'état de citrate de potassium, le bacille ne se développe pas ou se développe très mal. Dans les ballons de culture, 20 jours après l'ensemencement, il n'y a, flottant épars à la surface du liquide clair, que de légers filaments grêles, discontinus, pelliculaires et transparents ; au bout d'un mois l'aspect est demeuré le même et d'ailleurs ne change plus. Le liquide n'a acquis aucune odeur aromatique.

Un tel résultat était à prévoir, du moins avec cette dose de citrate, puisque je n'ai obtenu aucun développement microbien sur les milieux au galactose, au maltose et au saccharose, qui contenaient également 2 gr. d'acide citrique par

litre, et on ne saurait supposer que ces sucres ont une action empêchante. — Mais des ensemencements faits sur des milieux renfermant 20 et 40 gr. de citrate de potassium ou de sodium par litre n'ont pas mieux réussi.

Le carbone apporté par l'acide citrique, quelle qu'en soit la quantité, ne suffit donc pas, pas plus que ne paraît suffire celui apporté par l'asparagine ; et si certains microorganismes peuvent se développer en présence d'acides aminés qui assurent seuls la nutrition de l'espèce bactérienne ou fongique en lui fournissant à la fois le carbone et l'azote nécessaires, le bacille tuberculeux se montre beaucoup plus exigeant.

5
VALEUR ALIMENTAIRE COMPARÉE DE LA GLYCÉRINE, DU GLUCOSE ET DU LÉVULOSE.

Mes essais de culture avec les alcools polyatomiques ou les sucres comme aliments carbonés ont montré que le glucose assure, dans le même temps, une récolte plus abondante que la glycérine, qui elle-même en assure une plus abondante que le lévulose, malgré un apport égal de carbone de part et d'autre et toutes choses égales d'ailleurs.

Mais dans l'utilisation par le bacille tuberculeux de ces trois aliments comme source de carbone, le rapport existant entre le poids de substance formée et le poids de l'aliment carboné consommé, en d'autres termes le rendement, est-il constant ?

J. Laborde, qui avait donné ces mêmes aliments à l'*Eurotiopsis Gayoni* avait trouvé pour les rendements les valeurs suivantes :

Glycérine	0,31
Lévulose	0,30
Glucose	0,29

Avec le *Sterigmatocystis Nigra*, Czapek obtint les coefficients économiques :

Lévulose	0,52
Glucose	0,47
Glycérine	0,29

Ils varient donc nettement avec la composition chimique du milieu. Terroine et Wurmser, qui ont proposé d'appeler

ces coefficients économiques « Rapport d'utilisation » ont recherché si ce rapport varie ou non, pour *un même milieu*, avec la vitesse du développement mycélien. — Leurs recherches furent faites avec le *Sterigmatocystis Nigra*, et l'aliment carboné offert fut le glucose. La rapidité plus ou moins grande du développement de la moisissure était déterminée non plus par la nature des substances utilisées puisque le milieu demeurait le même, mais par les températures différentes auxquelles étaient laissées les cultures.

Terroine et Wurmser constatèrent ainsi que le rapport d'utilisation ne variait pas avec la température et conservait une valeur moyenne de 0,43 quoique les vitesses du développement à 22° et à 36° par exemple fûssent différentes un peu plus que dans le rapport de 1 à 2.

Pour établir le rapport d'utilisation dans les cultures du bacille tuberculeux lorsque l'élément ternaire essentiel est la glycérine ou le glucose ou le lévulose, la détermination du poids sec de substance formée n'est pas une donnée suffisante : la composition chimique du bacille tuberculeux, et en particulier sa richesse en carbone, varie en effet notablement avec la nature de l'aliment carboné, comme je l'indiquerai au Chapitre III. J'ai donc dosé le carbone dans la culture recueillie, et celui restant dans le liquide sur lequel elle s'était développée ; j'ai dosé d'autre part le carbone initial dans un milieu témoin. La différence entre le carbone initial et le carbone final, dans le milieu de culture, donne le carbone consommé ; la différence entre le carbone consommé et le carbone des bacilles représente le carbone qui n'a pas été incorporé à la matière vivante mais a servi aux besoins énergétiques du microorganisme.

Dans les milieux sucrés que j'ai utilisés, se contenter d'un dosage du sucre et en déduire, par le calcul, la quantité de carbone n'est pas possible : ils renferment en effet d'autres aliments carbonés non réducteurs, l'acide citrique et l'asparagine. Une analyse organique est donc nécessaire. Elle s'impose davantage encore pour le milieu glycériné puisqu'il n'existe actuellement aucune méthode rigoureuse qui permette un dosage direct de la glycérine.

Ni les liquides de culture ni les bacilles ne furent préalablement stérilisés, afin d'éviter toute perte de produits volatils par la stérilisation. La même raison proscrivait une évaporation préalable des liquides de culture.

Pour effectuer ces dosages de carbone je me suis servi de l'appareil imaginé par DESGREZ pour la détermination du carbone urinaire total. Je l'ai modifié toutefois selon les indications de DONZÉ et LAMBLING, c'est-à-dire que l'appareil fut complété par un tube à oxyde de cuivre que chauffe une grille à gaz comme dans les combustions par la méthode de DUMAS : on achève ainsi la combustion de l'oxyde de carbone qui se produit toujours en petite quantité dans l'oxydation des matières organiques par l'acide chromique. [1])

Pour éviter autant que possible tout phénomène d'autolyse, les cultures furent retirées de l'étuve 18 jours après l'ensemencement.

Les résultats que j'ai obtenus sont consignés dans le Tableau III.

1° Rendement matériel. —

La conclusion de fait qui se dégage de l'ensemble des résultats expérimentaux, c'est que le bacille tuberculeux montre des différences très grandes dans le rendement matériel d'utilisation selon la composition ou la structure de l'aliment ternaire, le milieu étant identique par ailleurs. C'est la glycérine qui a le coefficient d'utilisation le plus élevé (0.47), celui du glucose étant 1,67 fois faible (0,28). Quant au lévulose il est très mal utilisé par le bacille tuberculeux. D'autre part la moitié environ du carbone fourni par la glycérine est employée à la formation de la substance vivante, l'autre moitié étant brûlée sous forme d'anhydride carbonique. Avec le glucose, ce sont les deux-tiers du carbone consommé qui sont ainsi brûlés, et avec le lévulose 90 pour 100.

---

[1]) Valeur de la méthode :

		Calculé	Trouvé
Dosage du carbone dans	l'urée	gr. 20,0 %	19,94%
	l'asparagïne	32,0 —	31,35—
	la glycérine (D : 1,254) . .	15,63—	15,0 —
	le glucose	16,0 —	16,20—
	le saccharose	42,10—	42,02—
	le citrate de sodium . . .	19,04—	19,12—

TABLEAU III.

Utilisation par le bacille tuberculeux du carbone contenu dans le liquide de culture, l'aliment ternaire étant la glycérine, ou le glucose, ou le lévulose.

(Les résultats sont donnés en grammes et par litre).

Milieux ensemencés	Liquide de culture (ramené au volume initial)			Récoltes			Rapports	
	Carbone dans le liquide témoin non ensemencé et laissé à l'étuve 18 jours C. I.	Carbone dans le liquide de culture 18 jours après l'ensemencement C. F.	Carbone disparu c'est-à-dire carbone consommé C. C.	Poids sec de la récolte P.	Teneur en carbone C. B.	Carbone employé aux besoins énergétiques (CO^2) C. C. – C. B.	$\frac{C.\ B.}{C.\ C.}$ (Rendement matériel)	$\frac{C.\ C. - C.\ B.}{C.\ C.}$
Milieu à la glycérine :	19,25	1° 12,49	6,76	6,14	3,248	3 51	0,48	0,52
		1bis 12,43	6,82		3,264	3,55	0.47	0,52
		2° 12,90	6,37	5,71	2.986	3,38	0,46	0,53
		Moy.: 12,60	*6,65*	*5,92*	*3,166*	*3.48*	*0,47*	*o,52*
Milieu au glucose.... :	19,64	1° 3,27	16,37	9,76	4,774	11,59	0,29	0,70
		2° 3,93	15,71	9,04	4,458	11,25	0,28	0,71
		Moy.: 3,60	*16,04*	*9,04*	*4,606*	*11,43*	*0,28*	*o,71*
Milieu au lévulose.... :	19,70	1° 15,40	4,32	0,68	0,339	3,98	0,78	0,92
		2° 16	3,68	0,72	0,361	3,32	0.97	0,90
		Moy.: 15,70	*4*	*0,70*	*0,35*	*3,65*	*0,09*	*o,91*

C. I. = Carbone initial ; C. F. = Carbone final ; C. C. = Carbone consommé ; C. B. = Carbone bacillaire.

Il convient de remarquer que le développement est plus rapide avec le glucose. Il convient de remarquer aussi que les organismes récoltés n'ont pas une composition identique, les bacilles développés sur milieu au glucose présentant comparativement à ceux développés sur milieu glycériné une diminution de 60 pour 100 dans la teneur en matières grasses.

Ces différences dans le rendement matériel des processus de croissance laissent prévoir des variations dans les rendements énergétiques. Mais avant de chercher à les déterminer, il importe d'établir le bilan énergétique aussi complètement que possible afin de s'assurer si l'énergie fournie par l'aliment carboné consommé est, non pas rigoureusement certes, mais à peu près retrouvée pour une part dans l'énergie emmagasinée par l'organisme et pour une autre part dans l'énergie respiratoire que représente la quantité d'anhydride carbonique dégagé au cours du développement, c'est-à-dire si l'on a sensiblement l'égalité :

$$U_1 - U_2 = U' + U''$$

$U_1 - U_2$ représentant la variation d'énergie de l'aliment, ou l'apport d'énergie,

U', l'énergie de la matière vivante formée,

U'', l'énergie disparue sous forme de CO^2.

2° Etablissement du bilan énergétique. —

Ayant déterminé la teneur en matières grasses, protéiques et hydrocarbonées des bacilles développés sur milieu glucosé ou glycériné, je me suis servi des données calorimétriques connues pour calculer les valeurs énergétiques correspondantes.

A. — *Dans le milieu au glucose*, d'après les dosages faits, 38 gr. de ce sucre auraient été consommés, dont la combustion représente : 38 × 3 cal., 76 = 142 cal., 88. — Mais 38 gr. de glucose correspondent à 15 gr., 20 seulement de carbone—; or il en est disparu 16 gr., 04. Le carbone complémentaire, soit 0 gr., 84, proviendrait du carbone de l'asparagine et, pour une faible part, de celui de l'acide citrique. Si, pour simplifier, on le considère comme uniquement fourni par l'asparagine, il représente 2 gr., 31 de cette amide, soit 7 cal., 85 (la chaleur de combustion de l'asparagine étant de 3 cal., 4 par gramme.) Le carbone consommé aurait donc fourni au total 142,88 +

7,85 = 150,73 calories. Telle est l'énergie disparue du milieu, c'est-à-dire $U_1 - U_2$.

Quelle quantité de calories représentent d'autre part la récolte et le carbone brûlé sous forme d'anhydride carbonique ?

Les 9 gr., 40 de bacilles secs recueillis renferment 1 gr., 37 de matières grasses totales (extrait alcoolique complété par la saponification du résidu) et 6 gr., 19 de matières protéiques (Az. total × 6,25) ; la différence comprend les cendres et les substances hydrocarbonées. Le poids des cendres est en moyenne de 8 gr. pour 100 gr. de bacilles secs, soit 0 gr., 75 pour 9 gr.,40 ; il resterait donc 1 gr.,09 d'hydrates de carbone. Dès lors, on peut calculer comme suit la valeur énergétique de la récolte :

1,37	graisses	× 9,4	=	12,87
6,19	protéiques	× 4,8	=	29,71
1,09	hyd. de C.	× 3,76	=	4,01
0,75	cendres.			
9,40				46,59 calories

D'autre part, il y a 11 gr., 43 de carbone disparu sous forme d'anhydride carbonique, soit 41 gr., 91 ou 21198 cm^3 de ce gaz (1 litre de CO^2 pesant 1 gr., 977). La substance comburée étant du glucose, on peut appliquer au gaz carbonique le coefficient thermique de la combustion des hydrates de carbone, soit 0,005 calorie par centimètre cube, ce qui donne 21198×0,005=106,47 calories pour U".

L'énergie totale représentée par la récolte et par l'anhydride carbonique formé aux dépens du carbone disparu du milieu atteint donc 46,59+106,47=153,06 calories. Telle est la valeur de U'+U", c'est-à-dire sensiblement celle de $\overline{U_1}—U_2$.

Les deux calories trouvées en excès peuvent résulter du fait que le poids de la récolte, calculé pour un litre, peut lui-même pêcher par excès ; du fait aussi que les coefficients employés pour calculer les matières protéiques d'après l'azote total ou les calories ne sont peut-être pas absolument adéquats aux composants du bacille tuberculeux. En tout cas l'écart est de l'ordre des erreurs expérimentales.

B. — *Dans le milieu à la glycérine*, 6 gr., 65 de carbone ont disparu. Par analogie avec ce qui a lieu dans le milieu glucosé, on peut supposer qu'une petite partie de ce carbone provient

de l'asparagine, quantité qui, évaluée proportionnellement au poids de la récolte, serait d'environ 0 gr., 60 soit 1 gr., 65 d'asparagine. Il resterait 6 gr. de carbone fournis par la glycérine et représentant approximativement 15 gr. de celle-ci (théoriquement 15 gr., 33).

Or, la combustion de 15 gr. de glycérine dégage 64,65 calories ($15 \times 4{,}31$),
la combustion de 1 gr., 65 d'asparagine dégage 5,61 calories

au total 70,26 calories

Telle est l'énergie disparue du milieu, c'est-à-dire $U_1 — U_2$. D'autre part les 5 gr., 92 de bacilles secs recueillis renferment 2 gr., 18 de matières grasses et 3 gr., 14 de matières protéiques. La différence représente les substances minérales, 0 gr., 47, (calculées à raison de 8 gr. pour 100 gr. de bacilles secs) et les substances hydrocarbonées, 0 gr., 13. Dès lors on peut calculer ainsi la valeur énergétique, U', de la récolte :

2,18	graisses	× 9,4	=	20,49
3,14	protéiques	× 4,8	=	15,55
0,13	hydr. de C.	× 3,76	=	0,49
0,47	cendres			
5,92				36,53 calories

Quant au carbone (3 gr., 48) disparu sous forme de gaz carbonique, il correspond à 12 gr., 76 de ce gaz, soit 6454 cm^3 Ce volume multiplié par 0,005 donne, pour U'', 32,27 calories. La valeur totale U' + U'' est donc 36,53+ 32,27=68,80 calories, c'est-à-dire, ici encore, sensiblement l'énergie $U_1 — U_2$ disparue du milieu, l'écart (1 cal., 46), par défaut cette fois, étant de l'ordre des erreurs expérimentales.

Ainsi, qu'il s'agisse de la culture sur milieu glycériné ou de la culture sur milieu glucosé, les bilans descalories fournies d'une part, et emmagasinées ou perdues d'autre part, s'équilibrent suffisamment pour permettre de calculer, de manière approchée, le rendement énergétique, c'est-à-dire le rapport entre l'énergie emmagasinée dans la substance vivante et l'énergie métabolisable fournie par le milieu, selon la formule :

$$\frac{U_1 — U_2}{U'}$$

3° Rendement énergétique. —

Avec le milieu glucosé, il serait : $\frac{49,59}{150,73} = 0,31$,

et avec le milieu glycériné : . . . $\frac{36,53}{70,26} = 0,52$.

Mais à la vérité ces calculs demeurent un peu théoriques, et les formules qui doivent exprimer le bilan et le rendement énergétiques ne sont pas tout-à-fait aussi simples.

Dans le liquide de culture restent en effet, après le développement, des produits de dégradation et d'excrétion dont la valeur énergétique, U_R, doit entrer en ligne de compte, et les formules deviennent,

pour le bilan : $U_1 - U_2 = U' + U'' + U_R$

pour le rendement : $\frac{U'}{(U_1 - U_2) - U_R}$

Sans doute, puisque mes calculs reposent sur un dosage de carbone total et non sur un simple dosage du glucose ou de la glycérine consommés, l'erreur est très atténuée, mais elle n'est pas tout-à-fait négligeable car la valeur énergétique de ces produits de dégradation et d'excrétion reste inconnue.

Un calcul rigoureux n'est possible que si l'on brûle à la bombe, avant et après le développement, l'extrait sec du liquide en ayant soin de le traiter convenablement pour empêcher la perte des produits volatils. On aurait ainsi l'énergie vraie disparue du milieu. Ignorant d'autre part la valeur énergétique réelle des composants du bacille, il faudrait brûler de même les cultures correspondantes.

Il y a plus : même ainsi on n'obtient jamais qu'un « rendement apparent », un « rendement brut », et non pas le rendement énergétique réel des processus qui aboutissent à la synthèse des matériaux constitutifs des organismes formés ; il faudrait en effet défalquer de la quantité totale d'énergie disparue du milieu l'énergie, U_E, qui a servi à couvrir la dépense d'entretien en l'absence de tout développement. Le rendement réel s'exprimerait donc par la formule :

$$\frac{U'}{(U_1 - U_2) - (U_R + U_E).}$$

Toutes ces mesures délicates, — auxquelles le bacille tuberculeux, d'un maniement difficile, se prête mal—, ont été réalisées par Terroine et Wurmser dans leur belle étude sur « Le développement de l'Aspergillus niger. » Comme *rendement énergétique brut*, calculé simplement après combustion du mycélium à la bombe et dosage du sucre disparu du milieu de culture, Terroine et Wurmser avaient trouvé 0,56, c'est-à-dire une valeur voisine de celle obtenue pour le bacille tuberculeux développé sur milieu glycériné. Pour établir le rendement énergétique réel, la détermination de l'anhydride carbonique correspondant à l'entretien *dans les conditions même de la croissance* était particulièrement difficile à effectuer.On ne pouvait en effet se borner à priver le mycélium de carbone et d'azote sans risquer de provoquer un état de vie ralentie. Terroine et Wurmser ont résolu le problème en faisant varier considérablement la vitesse du développement. Ils ont reconnu ainsi que le *rendement énergétique réel* des processus de croissance de l'Aspergillus atteint environ 70%, « valeur de même ordre que celle trouvée dans la croissance des mammifères. Les rendements énergétiques de la croissance paraissent donc toujours très élevés et très voisins chez tous les êtres hétérotrophes qui tous semblent obéir à une même loi énergétique ». Cette conclusion était loin de ressortir des expériences antérieurement faites qui montraient les variations les plus diverses (11,5% dans le bac. typhique, Rubner ; — 87% dans le ver à soie, Farkas). Le rendement énergétique serait au contraire très faible chez les autotrophes (Bactéries nitrifiantes : 4,5%, V. Henri).

En ce qui concerne le bacille tuberculeux, le rendement énergétique calculé ne peut qu'être approximatif et en tout cas n'est que le *rendement énergétique brut*, dont la valeur est inférieure à la réalité. Il suffit néanmoins pour mettre en évidence la grande influence de la nature de la matière ternaire dans l'utilisation de l'énergie métabolisable. Il montre que 4 gr., 04 de glucose représentant 15 cal., 19 sont consommés pour édifier 1 gramme sec de bacille tuberculeux dont la chaleur de combustion calculée est 4 cal., 95 ; — alors que 2 gr., 53 seulement de glycérine représentant 10 cal., 88 sont consommés pour édifier de même 1 gramme sec de bacilles dont la chaleur

de combustion est 6 cal., 17 (à cause de leur plus grande teneur en matières grasses).

Ainsi, avec le glucose comme aliment ternaire, une partie importante de carbone est brûlée qui ne sert pas. Le glucose est, pour le bacille tuberculeux, comparativement à la glycérine, un aliment gaspillé.

6.

INFLUENCE DA LA QUANTITÉ D'ALIMENTS.

Proskauer et Beck avaient déclaré qu'au delà d'un certain minimum la quantité des aliments offerts au bacille tuberculeux n'avait pas grande influence sur le poids de la récolte, et dans la composition de leur milieu ils s'étaient en particulier arrêtés aux doses de 15 gr. de glycérine et 4 gr. d'asparagine par litre de liquide nutritif. En d'autres termes, pour Proskauer et Beck, il n'y aurait pas de doses optima : il y a un minimum au-dessus duquel la production de substance vivante n'est pas sensiblement accrue. — Ces déclarations des bactériologistes allemands demeurent assez communément admises. Fondées peut-être en ce qui concerne les éléments minéraux, elles ne sont pas exactes par ailleurs, ou sont pour le moins trop absolues.

S'il est vrai en effet que 15 gr. de glycérine par litre peuvent suffire au développement du bacille tuberculeux, s'il est vrai encore qu'au bout de 10 mois (?) de culture les 15 gr. de glycérine par litre ne sont pas toujours entièrement utilisés (Tiffeneau et Marie), il ne s'en suit pas qu'un taux plus élevé d'aliment ternaire soit superflu et sans avantage. Les résultats réunis dans le Tableau IV prouvent que, *pour une durée de culture relativement courte* (20 jours), le poids de récolte varie très sensiblement sinon avec la concentration en asparagine quand elle passe de 5 gr. à 10 gr., du moins avec la concentration en glycérine quand on l'élève au-delà de la quantité que, d'après Proskauer et Beck, il était indifférent et inutile de dépasser. Pourtant, étant donnée la durée à dessein limitée de l'expérience, les milieux même pauvres en aliments renfermaient néanmoins plus d'azote et d'hydrate de carbone que n'en utilisait la culture obtenue ; — en d'autres termes il n'y avait, en

TABLEAU IV.

Influence de la concentration en asparagine et en glycérine sur la production de substance vivante [1])

Asparagine par litre (en grammes)	**Glycérine** par litre (en grammes)	**Poids sec de la culture** 20 jours après l'ensemencement		**Azote** restant par litre
		par ballon renfermant 50 cm³ de liq. nutritif *)	calculé par litre de liq. nutritif	dosé par la méthode de Kjeldahl
10 (=1,86 d'Az.)	40	0,278	5,56	1,27
10	20	0,210	4,20	»
10	10	0,097	1,94	»
5	40	0,237	4,74	»
5	20	0,174	3,48	»
5	10	0,080	1,60	»

*) Moyenne des récoltes de 3 ballons.

TABLEAU V.

Influence de la concentration en asparagine et en glucose sur la production de substance vivante [1])

Asparagine par litre (en grammes)	**Glucose** par litre (en grammes)	**Poids sec de la culture** 20 jours après l'ensemencement		**Glucose** restant par litre	**Azote** restant par litre
		par ballon renfermant 50 cm³ de liq. nutritif *)	calculé par litre de liq. nutritif	dosé par la méthode de Bertrand	dosé par la méthode de Kjeldahl
10	40	0,480	9,60	1,60	0,735
10	20	0,248	4,96	»	»
10	10	0,102	2,04	»	»
5	40	0,372	7,44	»	»
5	20	0,178	3,56	»	»
5	10	0,091	1,82	»	»

*) Moyenne des récoltes de 3 ballons.

[1]) Ensemencement fait avec des bacilles humains « Test de l'Institut Pasteur. »

aucun cas, disette de substance azotée et de substance hydrocarbonée. Proskauer et Beck, il est vrai, ne pesaient pas les récoltes, mais évaluaient seulement l'étendue de la culture à la surface du liquide nutritif.

Ces variations s'accentuent quand l'aliment ternaire est le glucose et c'est là surtout que les conclusions de Proskauer et Beck apparaissent hâtives et trop absolues. Le Tableau V montre la diminution notable du poids de la récolte quand on abaisse de 10 gr. à 5 gr. la quantité d'asparagine, et surtout quand on réduit de 40 gr. à 20 gr. la quantité de glucose (40 gr. et 20 gr. de glucose fournissent la même quantité de carbone que 40 gr. et 20 gr. de glycérine) : pourtant, ici encore, le milieu renferme dans tous les cas un excédent d'azote, mais d'autre part le développement s'arrête par *disette d'aliment ternaire.* La récolte croît donc proportionnellement à la quantité de glucose que contient le liquide nutritif ; elle atteint son maximum au moment où l'aliment hydrocarboné est à peu près intégralement consommé, et cela très rapidement ainsi que nous l'avons vu.

Il est à remarquer en outre qu'à égalité de poids de récolte, les bacilles consomment plus d'asparagine, c'est-à-dire plus d'azote, en milieu glucosé qu'en milieu glycériné : nous verrons au Chapitre III que les bacilles développés sur milieu renfermant du glucose comme aliment ternaire sont en effet plus riches en matières protéiques ; nous verrons également dans ce chapitre l'influence que peut avoir la concentration du milieu en aliment azoté sur la teneur du bacille en azote.

L'insuccès des tentatives de remplacement de la glycérine par le glucose ou les chétives cultures obtenues sont peut-être dus à la quantité insuffisante des aliments offerts. Ainsi les essais de Proskauer et Beck ont toujours été faits avec 10 gr. de sucre et 4 ou 5 gr. d'asparagine par litre : or le bacille ne trouve pas dans ce mélange à la fois une source d'énergie et une quantité d'aliments suffisantes pour ses besoins vitaux et son développement ; le milieu n'est pas physiologiquement équilibré. — Cet équilibre paraît plus essentiel que la valeur même de pH à laquelle on semble vouloir attribuer une importance peut-être trop absolue. Que la concentration en ions

H des milieux de culture ait une notable influence sur l'intensité du développement des bactéries, cela est incontestable. Mais le développement du bacille tuberculeux, surtout vis-à-vis du glucose, ne semble pas limité à des variations de pH particulièrement étroites.

7.
INFLUENCE DE DIVERS MÉTAUX.

L'examen des divers milieux employés pour la culture du bacille tuberculeux a montré que les bactériologistes ne s'étaient pas toujours limités aux seuls éléments minéraux jugés nécessaires, phosphore, soufre, potassium et magnésium, mais leur en avaient souvent adjoint d'autres reconnus par eux utiles, sinon indispensables.

Ainsi dans le milieu de Calmette, Massol et Breton entre du fer, métal que Sauton emploie également et dont la présence à la dose de 1 centimillième suffit, dit-il, pour tripler le poids de la récolte. Baudran, qui essaya l'action du fer et du manganèse plutôt dans un but d'atténuation de virulence, constata que les cultures poussaient beaucoup plus rapidement sur milieu avec manganèse que sur milieu additionné de fer. Par contre à Sauton le manganèse n'a paru jouer aucun rôle, pas plus d'ailleurs que le vanadium indiqué comme favorable par Frouin. C'est aussi la conclusion de Bezançon, Philibert et Baudin qui n'ont pas obtenu davantage une augmentation de culture avec le fer.

Il est vrai que ces métaux, le manganèse surtout, pouvaient exister déjà dans le milieu comme impuretés à l'insu des expérimentateurs, puisque tous les sels même les plus purs fournis par le commerce peuvent en renfermer (recherches de G. Bertrand). Indépendamment des produits, il existe même une autre cause d'introduction du manganèse : c'est l'attaque des vases de culture par le liquide porté au moment de la stérilisation à 120° (G. Bertrand et Javillier) ; aussi pour opérer avec toute la rigueur désirable serait-il bon d'utiliser seulement des vases en quartz fondu.

En me servant de sels très soigneusement purifiés, j'avais commencé à étudier l'action du manganèse, du fer et du cuivre,

à l'état de sulfates, sur le développement du bacille tuberculeux. Néanmoins n'étant pas sûr que des doses infinitésimales mais actives déjà n'aient pas été apportées malgré tout par les autres substances employées ou par le verre des vases, c'est-à-dire que mes solutions nutritives fûssent rigoureusement exemptes de manganèse, de fer ou de cuivre avant l'addition de ces métaux, puis surtout étant donné le nombre involontairement restreint de mes essais, je ne saurais fixer quelle est la limite minima d'action de ces trois corps.

Faut-il pour observer la courbe d'accroissement de récolte ajouter au milieu de culture des doses extrêmement petites, et pour observer l'influence nocive d'un excès de ces métaux ajouter des doses relativement fortes, — en d'autres termes le bacille tuberculeux est-il pour les doses extrêmes de manganèse, de fer ou de cuivre, très sensible et pour les doses moyennes très indifférent, comme le sont, par ex., le *Sterigmatocystis* vis-à-vis du zinc (Javillier) ou les phanérogammes vis-à-vis du bore (Agulhon) ? Ou bien la zone optima de concentration est-elle fort imprécise comme l'est celle du manganèse pour le *Sterigmatocystis* (G. Bertrand) ? Certes pour répondre à cette question mes expériences n'ont pu être faites aussi nombreuses qu'il eût fallu : qu'il me soit permis de les relater quand même malgré les conclusions restreintes qu'elles comportent.

Elles ont été effectuées en cultivant le bacille tuberculeux sur le milieu à la glycérine précédemment décrit, ayant une réaction acide égale à 18 cm^3 de liqueur Normale par litre, et additionné de sulfate de manganèse ou de sulfate de fer ou de sulfate de cuivre dans les conditions suivantes :

1re *Série d'expériences* : le manganèse, le fer et le cuivre sont ajoutés, à l'état de sulfates, en quantité telle qu'un litre de liquide nutritif renferme 1 centigramme de métal, soit une proportion de 1 /100 000.

Les milieux (3 ballons pour chacun des 3 métaux, et 2 ballons témoins) ont été ensemencés le même jour avec une öse du même voile développé sur bouillon peptoné et âgé de 10 jours.

Au point de vue « marche du développement », appréciée à l'étendue du voile, celle-ci est plus rapide dans les ballons contenant du manganèse, du fer ou du cuivre que dans les ballons témoins, et l'avance est surtout sensible avec le man-

ganèse. — Au point de vue « poids de récolte », 25 jours après l'ensemencement, il y a, comparativement avec les témoins, augmentation dans le rapport :

$$\frac{2,35}{1}$$ avec le fer

$$\frac{1,76}{1}$$ avec le manganèse

$$\frac{1,66}{1}$$ avec le cuivre

2e *Série d'expériences* : les métaux sont ajoutés dans la proportion de 1 /20 000 (soit 5 centigr. par litre).

Il y a tout d'abord une avance relative dans le développement sur le milieu au manganèse, mais au bout de 8 jours cette accélération fait place au contraire à un retard. Au 14e jour, alors que dans les ballons contenant le milieu au fer ainsi que dans les ballons témoins, le voile monte le long des parois, il couvre seulement la surface du liquide dans le milieu au manganèse et au cuivre ; 25 jours après l'ensemencement il ne s'est pas sensiblement plus développé sur le milieu au manganèse. Le poids sec de culture comparé à celui de la culture témoin, donne les rapports :

$$\frac{2,63}{1}$$ avec le fer

$$\frac{0,87}{1}$$ avec le manganèse

$$\frac{1,54}{1}$$ avec le cuivre

3e *Série d'expériences* : les métaux sont ajoutés dans la proportion de 1 /6.000 (soit 16 centigr., 6 par litre).

Il y a un notable retard dans le développement sur le milieu au cuivre et surtout sur le milieu au manganèse. Sur le milieu au fer, le voile se développe aussi rapidement que dans les expériences précédentes. Vingt-cinq jours après l'ensemencement, le poids sec de culture comparé à celui de la culture témoin donne les rapports :

$$\frac{1,80}{1}$$ avec le fer

$\frac{0,79}{1}$ avec le manganèse

$\frac{1,31}{1}$ avec le cuivre

4e *Série d'expériences* : les métaux sont ajoutés dans la proportion de 1 /3.000 (soit 33 centigr. par litre).

A cette dose, le cuivre se montre à son tour défavorable : il y a un retard dans le développement et le poids de la culture, après 25 jours d'étuve, est inférieur à celui de la culture témoin. Il est intéressant néanmoins de constater que ce métal, si toxique pour les plantes supérieures, l'est relativement peu vis-à-vis du bacille tuberculeux.

Quant au fer, il n'exerce à cette dose aucune action défavorable ni sur la marche du développement ni sur le poids de la culture. Celle-ci demeure même plus abondante que celle du milieu témoin dépourvu de fer, tout en étant d'aspect différent, croûteux et moins homogène.

Il ressort de ces essais que le bacille tuberculeux paraît être beaucoup plus sensible à l'action du manganèse qu'il ne l'est à celle du cuivre et surtout à celle du fer. Et parmi ces trois métaux, c'est le fer qui semble exercer sur le bacille l'action la plus favorable, avec la zone optima de concentration la plus étendue, celle du manganèse étant au contraire la plus restreinte.

Des essais semblables furent faits ultérieurement avec le milieu glucosé : les résultats furent comparables. Le cuivre en particulier ne s'est pas montré plus toxique qu'en milieu glycériné bien que l'addition de glucose à une solution de sulfate de cuivre exalte l'action d'arrêt qu'elle a sur la germination des spores de différents champignons, tandis que l'addition de glycérine réduit au contraire notablement cet effet nocif.

Les sulfates de manganèse, de fer et de cuivre, comme d'ailleurs les sels de vanadium, de cérium, de samarium dont Frouin a étudié l'influence et qu'il a reconnu activer la culture, présentent deux états d'oxydation. Or d'après les travaux de Haber, Job Engler, Manchot, G. Bertrand, tout sel d'un métal qui présente ainsi deux états d'oxydation (ou davantage)

intervient comme catalyseur dans les réactions d'oxydation. D'autre part ces catalyseurs donnent lieu facilement à la production d'eau oxygénée surtout lorsqu'on augmente leur porportion.

Le bacille tuberculeux, très avide d'oxygène, demande pour se développer des oxydations énergiques, et V. Henri a émis l'hypothèse que le rôle des corps utilisés avec succès par Frouin consiste précisément dans une activation des réactions d'oxydation. Mais au-delà d'une certaine limite, à cause de l'eau oxygénée produite, ils deviennent antiseptiques et empêchent le développement : c'est ce que Frouin a constaté. Toutefois leur action nuisible peut être retardée par suite de la présence, dans le milieu nutritif, de glucose ou de glycérine, corps facilement oxydables qui retiendront une partie de l'action catalytique d'oxydation.

Pour clore ce chapitre concernant la culture du bacille tuberculeux sur différents milieux, il convient de dire que les résultats obtenus sont relatifs aux races expérimentées, et non pas absolus. Toutes les races peuvent ne pas présenter sur le même milieu et dans le même temps la même intensité de développement. — J'ajouterai toutefois que les essais sur mon milieu au glucose, étant donnée leur importance, ont été faits avec quatre races de bacilles humains (3 races isolées par nous — puis la race Test de l'Institut Pasteur) et une race de bacilles bovins : toutes ont donné des cultures à développement semblable et des récoltes moyennes identiques.

CHAPITRE II.

TRANSFORMATION DU MILIEU AU COURS DU DÉVELOPPEMENT MICROBIEN

(Produits sécrétés : Diastases et Toxines.)

Dans la cellule organique qu'est le microbe s'accomplissent des fonctions multiples par des échanges continuels entre le protoplasma et le milieu extérieur : tous les phénomènes vitaux se ramènent à ces échanges. En se développant donc sur un milieu de culture favorable, le microbe d'une part en assimile les composants soit tels quels soit après dissociation opérée souvent par des diastases appropriées, — d'autre part rejette dans le milieu des produits d'excrétion. Il s'en suit que le milieu se modifiera au cours du développement par perte ou transformation de certaines substances et apport d'autres.

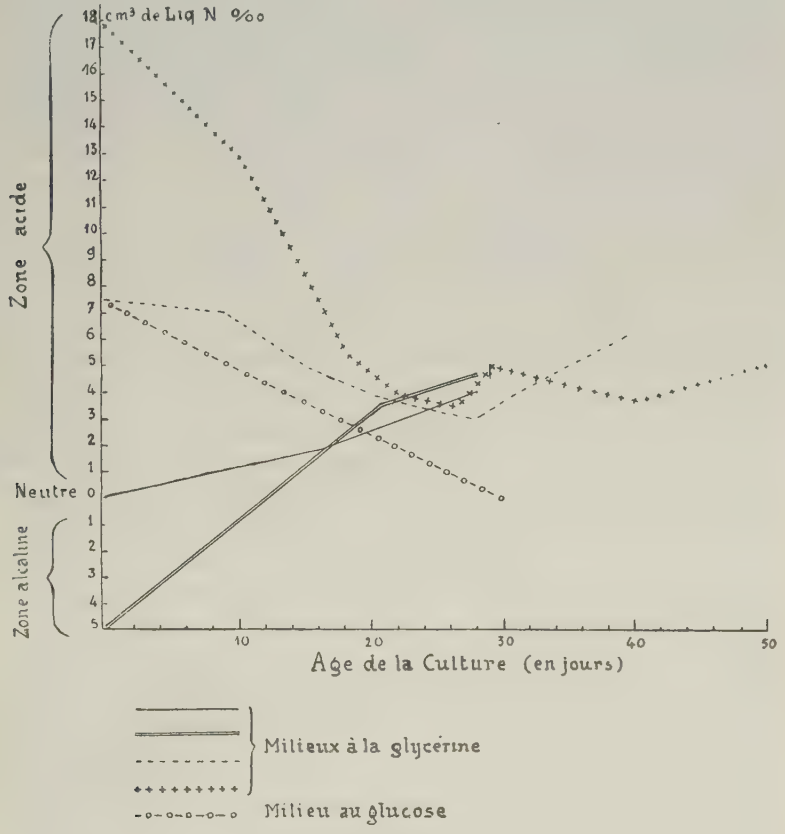
1.

CHANGEMENTS DE RÉACTION.

Nous avons vu dans le Chapitre précédent que si le bouillon peptoné glycériné paraît mieux convenir au développement du bacille tuberculeux lorsque la réaction initiale est alcaline, par contre le milieu défini à l'asparagine et à la glycérine que j'ai utilisé s'est montré plus favorable à un rapide développement quand il est acide, la zone acide optima de départ étant comprise entre 15 et 18 cm^3 de liqueur Normale par litre. S'il est neutre ou alcalin, le bacille ne s'y développe normalement qu'après l'avoir rendu acide. J'ai vérifié d'autre part que cette acidification n'est pas le fait d'une action spontanée. Le graphique ci-contre représente le changement des réactions (Graphique1).

GRAPHIQUE I.

Variations de la réaction du milieu au cours du développement (exprimées en centimètres-cubes de Liqueur Normale, la phénolphtaléine servant d'indicateur. — Dans les dosages successifs le volume du liquide est ramené au volume initial.)



Mes expériences ont été faites avec des bacilles tuberculeux humains. Or Théobald Smith a constaté que le bacille humain cultivé sur bouillon glycériné (30 à 50 gr. de glycérine par litre) et acidifié (acidité comprise entre 10 et 20 cm³ de liqueur Normale par litre) commence par diminuer l'acidité du milieu jusqu'à le rendre neutre ou même légèrement alcalin, puis qu'il y a retour à l'acidité, laquelle redevient sensiblement égale ou même supérieure à la réaction initiale vers le 30e jour après l'ensemencement. — Au contraire avec le bacille bovin, dans les mêmes conditions de culture, l'alcalinité atteinte est plus grande, dure beaucoup plus longtemps et jamais l'acidité ne remonte au degré initial. — Smith pense que la différence de réaction est due à une différence d'utilisation de la glycérine par l'un et l'autre bacille : en effet, lorsque la proportion de glycérine est faible (depuis quelques traces jusqu'à 3 gr. par litre) les différences s'atténuent et en bouillon peptoné sans glycérine les 2 types donnent deux courbes semblables.

Grund, qui a repris et vérifié les expériences de Smith, spécifie que si la distinction établie par cet auteur est vraie, il existe toutefois entre les types extrêmes des types moins nets et un certain nombre de bacilles bovins s'éloignent peu du type humain au point de vue de la réaction du bouillon glycériné pendant le développement de la culture.

Quoi qu'il en soit, avec mon milieu simple, chimiquement défini, comprenant de l'asparagine et de la glycérine et ayant une réaction acide initiale égale à 18 cm³ de liqueur Normale par litre, j'ai bien constaté toujours une diminution de l'acidité au commencement du développement des bacilles humains que j'avais ensemencés, mais jamais le milieu n'est devenu alcalin ni même neutre (la phénolphtaléine étant prise comme indicateur) et jamais il n'y a eu retour à l'acidité initiale.

Smith n'indique pas l'indicateur dont il s'est servi ; de plus et surtout il semble bien que ses déterminations aient été faites sur le bouillon non ramené à son volume primitif : dans ces conditions, si elles conservent toute leur valeur relative pour établir une comparaison entre l'action du bacille humain et celle du bacille bovin, elles n'ont aucune valeur absolue à cause de la concentration de plus en plus grande et d'ailleurs

variable du liquide pendant son séjour à l'étuve ; cette concentration croissante détermine en effet un accroissement parallèle de l'acidité du milieu.

Au reste, les courbes varient naturellement beaucoup avec la composition du milieu puisqu'elles sont fonction de la dégradation des composants, et avec la marche du développement : ainsi le milieu avec asparagine et glucose, ensemencé dans les mêmes conditions que le milieu asparagine et glycérine, accuse une perte d'acidité beaucoup plus grande dans le même temps. — En outre j'ai reconnu que des bacilles humains de souches différentes peuvent, en se développant sur un même liquide nutritif chimiquement défini, faire varier différemment la réaction de ce liquide selon la rapidité qu'ils montrent à attaquer les aliments offerts.

2.
DÉGRADATION DE L'ASPARAGINE ET DES ALIMENTS TERNAIRES.

A. — MILIEU AVEC ASPARAGINE ET GLYCÉRINE.

Deux mois après l'ensemencement et séjour à l'étuve à 37—38°, la culture est filtrée sur bougie. Le filtrat est divisé en deux portions, 1 et 2, qui servent aux essais suivants :

Portion 1. — a) *Recherche des produits volatils neutres* :

Le filtrat exactement neutralisé au moyen d'eau de chaux est distillé au tiers environ, dans le vide.

Le distillat, neutre, a l'odeur aromatique des cultures. Il ne donne ni la réaction de Legal (nitroprussiate de sodium additionné de soude et d'ac. acétique), ni précipité avec le réactif de Denigès (sulfate mercurique). Mais il réduit, très faiblement, le bichromate de potassium en solution nitrique (réactif d'Agulhon) ; il réduit l'azotate d'argent ammoniacal ; il donne un précipité d'iodoforme par addition d'iode et de soude ; il recolore légèrement la fuschine bisulfitée. On a donc affaire non à de l'acétone, mais à une aldéhyde. (Dans les mêmes conditions d'expérience, le liquide d'un ballon témoin non ensemencé, mais laissé le même temps à l'étuve, ne donne pas ces réactions).

b) *Recherche des acides volatils* :

La partie non passée à la distillation est additionnée d'un léger excès d'acide oxalique, puis filtrée pour éliminer l'oxalate de calcium. On a ainsi en solution, à l'état libre, les acides qui existaient primitivement à l'état de sels de chaux, plus une petite quantité d'acide oxalique.

Le filtrat soumis à la distillation fractionnée donne des distillats acides dans lesquels j'ai caractérisé de l'acide formique par ses propriétés réductrices et la formation d'éther formique, — et de l'acide acétique, dégageant l'odeur alliacée du cacodyle en le chauffant avec un peu d'anhydride arsénieux.

Une partie de distillat, débarrassée de toute trace d'acide formique (par ébullition en présence d'oxyde de mercure), fut additionnée d'eau de baryte jusqu'a réaction alcaline, puis soumise à un courant d'acide carbonique jusqu'à réaction acide, enfin portée à l'ébullition et filtrée : le filtrat concentré dans la cloche à vide abandonne quelques cristaux, les uns aciculaires ou en lamelles, et d'autres losangiques paraissant être du propionate de baryum mais qu'il m'a été difficile de mieux identifier à cause de leur petite quantité.

Portion 2. — *Recherche des acides fixes.*

Le résidu de la distillation fractionnée précédente pourrait servir à la recherche des acides fixes. L'ayant additionné d'eau distillée, il suffirait de neutraliser cette solution aqueuse par le carbonate de chaux pour éliminer l'acide oxalique, filtrer et concentrer à un faible volume, puis épuiser par l'éther après addition d'acide chlorhydrique : l'extrait éthéré renfermerait les acides fixes que l'on rechercherait selon la technique de Mestrezat. Mais j'ai craint qu'une partie d'entre eux échappât malgré la solubilité de leurs sels de calcium dans l'eau ; d'autre part un peu d'acide oxalique pourrait demeurer dissous qui nuirait à la caractérisation ultérieure de l'acide malique.

J'ai donc fait la recherche des acides fixes directement sur la portion 2 réservée à dessein et traitée de la façon suivante : on l'évapore tout d'abord au bain-marie jusqu'aux 9/10 de son volume environ ; on filtre, on ajoute de l'acide chlorhydrique en excès et on achève la dessication dans le vide. Le résidu, bien privé d'acide chlorhydrique, est trituré avec

du sable fin et épuisé par l'éther ; puis l'extrait abandonné par distillation de l'éther est dissous dans un peu d'eau distillée et la solution obtenue est soumise à la technique de MESTREZAT.

J'ai pu ainsi identifier de l'acide malique (réaction de DENIGÈS : production d'oxalacétate de mercure insoluble, par oxydation au moyen du permanganate de potassium en présence d'acétate mercurique [1]) et un peu d'acide succinique (dégagement de vapeurs extrêmement irritantes en chauffant ; — formation de succinate de fer de couleur ocre.)

B. — MILIEU AVEC ASPARAGINE ET GLUCOSE.

Les recherches précédentes furent faites dans les mêmes conditions sur le milieu de culture renfermant du glucose au lieu de glycérine.

a) — Dans la *recherche des produits volatils neutres*, j'ai caractérisé de l'aldéhyde ; mais le distillat donne avec une solution de bichromate de potassium et l'acide sulfurique, ainsi qu'avec le réactif d'AGULHON, un changement de coloration beaucoup plus accentué que celui obtenu dans l'essai similaire fait sur le distillat du milieu glycériné, et il contient sans doute, en outre de l'aldéhyde, un peu d'alcool éthylique.

b). — Dans la *recherche des acides volatils*, j'ai reconnu de même la présence des acides formique, acétique, et probablement propionique.

c). — Enfin dans la *recherche des acides fixes*, en outre des acides malique et succinique, j'ai caractérisé de l'acide lactique. Il fut séparé des acides malique et succinique en utilisant la solubilité de son sel de baryum dans l'alcool à 75° alors que les malate et succinate de baryum y sont insolubles ; l'identification fut faite par formation de lactate de zinc.

Je n'avais pas réussi à mettre nettement en évidence la présence de cet acide dans le milieu de culture avec glycérine.

---

[1]) Il importe d'éliminer au préalable par l'acétate mercurique toute trace d'acide citrique provenant du milieu de culture. J'ai d'ailleurs recherché et trouvé de même l'acide malique, après culture, dans un milieu qui n'avait pas été additionné d'acide citrique.

Quels peuvent être les processus de dégradation de l'asparagine et de l'aliment ternaire au cours du développement du bacille tuberculeux sur ces milieux chimiquement définis ?

En ce qui concerne l'asparagine, il y a une double hydrolyse libérant à l'état ammoniacal d'une part l'azote amidé, d'autre part l'azote aminé de la molécule.

L'hydrolyse du groupement amidé donnerait naissance à de l'aspartate d'ammonium :

$$COOH–CH^2–CHAzH^2–COAzH^2 + H^2O = COOH–CH^2–CHAzH^2–COOAzH^4.$$

Cette transformation, portant sur 10 gr. d'asparagine, arrive à être totale au bout d'un mois environ de culture. J'ai en effet, à des âges différents de la culture, dosé l'ammoniaque existant dans le liquide nutritif en le dégageant par distillation maintenue ½ heure en présence de magnésie et dans le vide à une température inférieure à 50°. Simultanément et dans les mêmes conditions j'ai dosé l'ammoniaque après avoir hydrolysé l'asparagine restée dans le liquide (cette hydrolyse est effectuée en ajoutant à 25 cm³ de liquide 2 cm³ d'acide chlorhydrique concentré et maintenant 1 heure au bain-marie bouillant). Enfin j'ai déterminé aussi l'ammoniaque total après traitement du liquide de culture par la méthode de KJELDAHL. Dans tous les cas l'ammoniaque dégagé fut titré au moyen d'une solution d'acide sulfurique déci-normale avec l'hélianthine comme indicateur.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau VI. Ils correspondent à une expérience faite sur un milieu contenant de la glycérine comme aliment ternaire ; l'acidité de départ était égale à 18 cm³ de liqueur Normale par litre et le milieu conservait d'ailleurs une réaction acide pendant tout le cours du développement : il n'y a donc pas eu de dégagement spontané d'ammoniaque.

D'après ces résultats, lorsque sensiblement la moitié de l'azote total de l'asparagine est passée à l'état ammoniacal, — c'est-à-dire entre le 25e et le 30e jour de culture dans l'expérience ci-dessus relatée —, l'hydrolyse de l'asparagine pouvant rester dans le liquide ne produit plus ou sensiblement

TABLEAU VI.

Marche de l'hydrolyse et de l'utilisation de l'asparagine par le bacille tuberculeux
(aliment ternaire : glycérine)

Age de la culture (en jours)	Ammoniaque dégagé par 100 cm³ de liquide avant hydrolyse par HCl (en mgr)	Ammoniaque dégagé par 100 cm³ de liquide après hydrolyse par HCl (en mgr.)	Ammoniaque total dégagé par 100 cm³ de liquide après Kjeldahl (en mgr)	Ammoniaque total dégagé par la culture correspondante après Kjeldahl (en mgr.)
0 (Témoin)	»	110	221	»
10	17,6	95,3	199	18
16	36,8	80,6	178,3	39,6
21	67	73,7	150,3	64,8
25	71,8	72,6	146,1	69,4
30	77,5	78	148,7	68,1
30 (Témoin)	3,4	109	220	»

plus aucune augmentation de la teneur du liquide en sel ammoniacal ; le groupement amidé se trouve donc en totalité hydrolysé.

Quant au groupement aminé, sa transformation aboutirait aux acides malique et succinique non pas peut-être par hydratation et passage direct de l'amino-acide à l'hydroxyacide, selon le processus :

$$COOH\text{-}CH^2\text{-}CHAzH^2\text{-}COOH + H^2O = COOH\text{-}CH^2\text{-}CHOH\text{-}COOH + AzH^3$$

et

$$COOH\text{-}CH^2\text{-}CHOH\text{-}COOH + H^2 = COOH\text{-}CH^2\text{-}CH^2\text{-}COOH + H^2O$$

mais plus vraisemblablement, et selon la théorie de NEUBAUER, par oxydation, c'est-à-dire par l'intermédiaire d'un hydrate d'imino-acide qui, par perte d'ammoniaque, donnerait l'acide oxalacétique (ou α cétonique) :

$$COOH\text{-}CH^2\text{-}CHAzH^2\text{-}COOH + O = COOH\text{-}CH^2\text{-}COHAzH^2\text{-}COOH.$$

$$COOH\text{-}CH^2\text{-}COHAzH^2\text{-}COOH = COOH\text{-}CH^2\text{-}CO\text{-}COOH + AzH^3.$$

Cet acide α cétonique produirait ensuite par hydrogénation d'abord l'acide malique, et celui-ci l'acide succinique par fixation d'hydrogène avec élimination d'une molécule d'eau :

$$COOH\text{-}CH^2\text{-}CO\text{-}COOH + H^2 = COOH\text{-}CH^2\text{-}CHOH\text{-}COOH.$$

$$COOH\text{-}CH^2\text{-}CHOH\text{-}COOH + H^2 = COOH\text{-}CH^2\text{-}CH^2\text{-}COOH + H^2O.$$

Le passage de l'acide succinique à l'acide propionique peut s'expliquer par une simple décarboxylation.

Quant au processus de formation des acides acétique et formique, il est plus difficile à déterminer et demeure assez obscur si on se limite à la dégradation de l'asparagine ; mais ces acides peuvent être des produits de transformation de la glycérine ou du glucose.

Les attaques des deux groupements azotés de l'asparagine sont-elles simultanées ou successives, la transformation de l'azote amidé précédant celle de l'azote aminé ? — Et d'autre part, si elles sont simultanées, est-ce l'azote du groupement amidé qui est utilisé par le bacille, celui qui existe à l'état ammoniacal dans le liquide provenant de l'hydrolyse de l'azote aminé, — ou bien est-ce l'inverse ?

Le Tableau VI montre que l'hydrolyse de la fonction amide commence de suite et se poursuit progressivement jusqu'à complète transformation puisqu'à un moment donné l'ébullition du liquide en présence d'acide chlorhydrique ne libère plus de sel ammoniacal. Mais dès le début du développement la différence que l'on trouve entre la quantité d'ammoniaque existant dans le liquide et la quantité théorique que doit fournir le groupement amidé de l'asparagine initale est bien inférieure à la quantité d'azote (exprimé en ammoniaque) que renferme la culture (cette différence va de 15 à 37 mgr.) : c'est dire que l'azote aminé a été attaqué aussi dès le début du développement. — Et il semble bien d'autre part que le bacille, ayant le choix, préfère l'azote aminé. Il consomme aussi vraisemblablement de l'azote amidé, mais il utilise mieux le groupement aminé. Nous avons vu, en effet, que le succinate d'am-

monium est un aliment azoté médiocre tandis que l'acide aspartique assure une culture rapide et abondante. Toutefois la transformation de l'azote aminé serait plus lente que celle de l'azote amidé et se ferait au fur et à mesure des besoins, l'ammoniaque étant consommé en même temps que libéré : en effet, après que le groupement amidé a été totalement hydrolysé on ne constate plus d'augmentation sensible de la teneur du milieu en azote ammoniacal. D'ailleurs dans le milieu contenant comme source d'azote de l'acide aspartique seul (4 gr. par litre ,soit 0 gr., 42 d'azote ou 0 gr., 51 d'ammoniaque) on ne trouve jamais que des traces d'azote ammoniacal dans le liquide : au 20e jour de la culture, je n'ai pu déceler que 0 gr., 006 d'ammoniaque par litre ; la culture en renfermait 0 gr., 39.

Des essais faits dans les mêmes conditions mais avec le glucose comme aliment ternaire ont donné des résultats de même sens. (Tableau VI bis).

L'acide lactique, dans le milieu au glucose, peut provenir du dédoublement de ce sucre en aldéhyde glycérique qui, par transposition moléculaire, donnerait ensuite son isomère l'acide lactique ; comme dans l'organisme animal, il y a passage probable par l'aldéhyde pyruvique ou méthylglyoxal, lequel,

TABLEAU VIbis

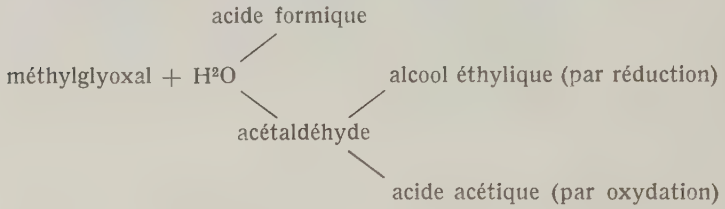
(Aliment ternaire : glucose)

Age de la culture (en jours)	Ammoniaque dégagé par 100 cm³ de liquide avant hydrolyse (en mgr.)	Ammoniaque dégagé par 100 cm³ de liquide après hydrolyse (en mgr.)	Ammoniaque total dégagé par 100 cm³ de liquide après Kjeldahl (en mgr.)	Ammoniaque total dégagé par la culture correspondante après Kjeldahl (en mgr.)
0 (Témoin)	»	110,5	221,7	»
20	51,8	56,5	130	87
25	60,7	62,9	95,4	121

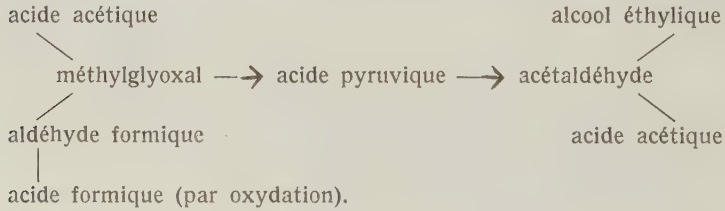
en fixant une molécule d'eau (réaction de CANNIZZARO interne) donnerait l'acide lactique :

$$C^6H^{12}O^6 \longrightarrow CH^2OH-CHOH-COH \longrightarrow H^2O+CH^3-CO-COH.$$
$$CH^3-CO-COH+H^2O=CH^3-CHOH-COOH.$$

Le méthylglyoxal, étape également du métabolisme de la glycérine, peut d'ailleurs de son côté donner par hydrolyse de l'acide formique et de l'acétaldéhyde ; celle-ci, par une réaction de CANNIZZARO, se transformerait en alcool éthylique et acide acétique. On aurait schématiquement :



On pourrait aussi schématiser de la façon suivante les transformations du méthylglyoxal, en supposant que par fixation d'une molécule d'eau il donne de l'acide acétique et de l'aldéhyde formique selon le processus indiqué déjà par FERNBACH dans l'attaque de la glycérine et des sucres par le *Tyrothris tenuis* :



BLANCHETIÈRE qui a étudié récemment l'action du bacille fluorescent liquéfiant de FLÜGGE sur l'asparagine, donnée comme unique source de carbone et d'azote, a constaté qu'avec ce bacille l'hydrolyse des groupements azotés se produisait en deux temps : d'abord hydrolyse du groupement amidé qui est très rapide et totale en moins de 8 jours, — puis hydrolyse du groupement aspartique plus lente mais s'effectuant aussi en totalité puisqu'au bout de 40 à 50 jours de culture 90 p. 100 de l'azote total de l'asparagine sont retrouvés à l'état ammoniacal dans le liquide.

Comme produits résultant de l'attaque il a trouvé également les acides acétique, malique, succinique et en outre l'acide fumarique que je n'ai pu mettre en évidence dans les produits de transformation de l'asparagine par le bacille tuberculeux. Il admet de même la formation transitoire de l'hydrate d'imino-acide, puis de l'acide oxalacétique dont la forme cétonique ordinaire donnerait par réduction l'acide malique tandis que la réduction de la forme œnolique produirait l'acide fumarique.

D'après Aubel une semblable dégradation de l'asparagine serait produite par le bacille pyocyanique, et dans le liquide de culture l'auteur a décelé les acides malique, fumarique, propionique et formique. Cultivé en présence de glucose, le bacille pyocyanique produirait aussi de l'acide acétique, de l'acide formique et de l'alcool éthylique.

3.
DIASTASES.

Chez les végétaux inférieurs, qui n'ont pas toujours le choix de l'aliment, la diffusion des diastases est très grande ; en particulier l'activité diastasique du *Penicillium glaucum* et surtout celle du *Sterigmatocystis nigra* peuvent s'exercer sur un nombre considérable de produits.

Toutes les diastases que le microorganisme a le pouvoir ou l'occasion d'utiliser ne sont d'ailleurs pas sécrétées d'une façon constante et en quelque sorte nécessaire ; leur production est souvent subordonnée à la qualité du milieu nutritif sur lequel il végète. Certaines diastases rares ou absentes dans certaines conditions deviennent prédominantes avec un autre aliment. Si on ensemence par exemple l'*Aspergillus glaucus* sur un liquide qui puisse le nourrir sans nécessiter l'intervention d'aucun ferment (telle est une dissolution de lactate de calcium additionnée de sels minéraux) il sécrétera de l'amylase seulement et en petite quantité ; si on remplace le lactate de calcium par du saccharose, il ne sécrètera que de la sucrase ; si on le cultive sur du lait, il produira de la présure.

Mais les mucédinées sont en général très polyphages, tandis que les bacilles ou les levures sont plus difficiles sur le

choix de leur nourriture et ne sécrètent qu'un petit nombre de diastases.

L'amylase est assez répandue chez les bactéries. Fermi en a trouvé en grande quantité dans les cultures sur gélatine et sur bouillon du bacille du charbon, des bacilles subtilis, ramosus et mégaterium. La sucrase a été signalée dans les bacilles butyrique et lactique par Huppe, et Vignal indiqua plusieurs bactéries de la bouche, entre autres le bacillus subtilis, qui intervertissent le sucre de canne. A.Brachin a vu que le bacillus coli communis dédoublait le lactose, mais seulement au fur et à mesure de ses besoins. Le vibrion septique, les bacilles du charbon symptômatique, du tétanos, du botulisme, le bacille perfringens, sécrètent une tryosine très active qui digère rapidement des cubes d'albumine cuite en milieu alcalin, et il semble bien établi d'ailleurs que la sécrétion de la diastase protéolytique soit fonction de la fonte du corps microbien : c'est à ces conclusions que sont arrivés Achalme, Malfitano et Strada, ainsi que Melle Lazarus.

Le bacille tuberculeux est-il susceptible, selon le milieu nutritif qui lui est offert, de produire certaines diastases ?

J'ai dit dans le chapitre précédent que, ensemencé sur milieu contenant du saccharose ou du lactose ou du maltose comme aliment hydrocarboné, il ne se développe pas et laisse ces sucres intacts, alors qu'il assimile le glucose et, quoique moins bien, le lévulose. En effet, le milieu au saccharose, non réducteur au moment de l'ensemencement, ne l'est pas davantage 1 mois ½ après ; ramené à son volume initial il donne au polarimètre une déviation sensiblement la même : $\alpha = + 5^{o}$ (à $+ 15^{o}$). Les rotations obtenues avec les milieux au lactose et au maltose n'ont pas non plus sensiblement changé [$\alpha = + 4^{o}$ (à $+ 15^{o}$) pour le milieu au lactose ; et $\alpha = + 10$ (à $+ 15^{o}$) pour le milieu au maltose] [1]), — et pas davantage

[1]) Saccharose employé (solution à 4%) : $(\alpha)\ D = \frac{+\ 5^{g},3 \times 50\ cm^{3}}{2\ gr. \times 2\ dec.} = + 66^{o},25$ (à $+ 15^{o}$)

Lactose employé (solution à 4%) : $(\alpha)\ D = \frac{+\ 4^{g},3 \times 50\ cm^{3}}{2\ gr. \times 2\ dec.} = + 53^{o},75$ (à $+ 15^{o}$)

leurs pouvoirs réducteurs [2]). En dosant selon la technique de G. BERTRAND l'oxyde cuivreux précipité, j'ai trouvé que le milieu au maltose renfermerait encore 37 gr., 1 de ce sucre anhydre par litre, et le milieu lactosé 37 gr., 4 de lactose anhydre, au lieu du nombre théorique de 38 gr. dans l'un et l'autre cas.

Ainsi les hexobioses, non consommables en nature, ne sont pas hydrolysées par le bacille tuberculeux lorsqu'on les lui donne comme seuls aliments ternaires : dans mes conditions expérimentales il ne produit donc ni sucrase, ni lactase, ni maltase.

Il n'hydrolyse pas davantage les polyoses (inuline, dextrine, amidon), du moins ne les amène pas au terme hexose (lévulose ou glucose) assimilable. Mais vraisemblablement il est susceptible d'hydrolyser certaines matières protéiques, les peptones par exemple, puisqu'il utilise bien cet aliment.

Toutefois ce sont là des indications imprécises et d'ailleurs forcément limitées. Pour les parfaire, j'ai donc recherché si d'une part les bacilles vivants séparés du liquide de culture et d'autre part le liquide même sur lequel ils s'étaient développés renfermaient des diastases hydrolysantes : mes essais ont

---

Maltose employé (solution à 4%) : $(\alpha)\ D = \frac{+\ 10^{o},5 \times 50\ cm^{3}}{2\ gr. \times 2\ dec.}$
$= +\ 131^{o},25$ (à $+\ 15^{o}$)

L'asparagine qui entre dans la composition de mes liquides nutritifs est également active sur la lumière polarisée, mais le sens de la déviation varie selon la réaction du milieu :

Une solution à 2% dans l'eau distillée est lévogyre et, observée sous une épaisseur de 2 décimètres, donne une déviation de : $\alpha = -0^{o},25$ (à $+\ 15^{o}$) d'où, pour l'asparagine crist. ($C^{4}H^{8}Az^{2}O^{3}+H^{2}O$) dont je me suis servi : $(\alpha)\ D = \frac{-\ 0^{o},25 \times 100\ cm^{3}}{2\ gr. \times 2\ dec.} = -6^{o},25.$,

Si on neutralise exactement la solution avec NaOH ou KOH (phtaléine comme indicateur), ou bien si on la rend nettement alcaline au tournesol, son pouvoir rotatoire est encore gauche et la rotation égale à : $\alpha = -0^{o},35$ (à $+\ 15^{o}$).

Au contraire si on acidifie la solution avec un acide minéral, $SO^{4}H^{2}$ p. ex., pour qu'elle soit franchement acide au tournesol, elle dévie à droite le plan de polarisation et d'une quantité plus grande : $\alpha = +\ 0^{o},8$ (à $+\ 15^{o}$).

[2]) Le maltose a un pouvoir réducteur égal à 61, le pouvoir réducteur du glucose étant égal à 100. Après interversion 100 gr. de maltose se transforment en 105 gr., 26 de glucose : le pouvoir réducteur qui était 61 devient 105,26. Ainsi par hydrolyse le pouvoir réducteur d'une solution de maltose se trouve augmenté dans le rapport de 61 à 105,26.

Le lactose a un pouvoir réducteur égal à 70.

porté sur des solutions de divers sucres, polyoses, glucosides, matières protéiques et sur des matières grasses ; — j'ai recherché en outre s'il existait des diastases oxydantes (oxydases ou peroxydases) et dédoublantes (alcoolase, catalase).

Le protocole des expériences et les résultats sont consignés dans les Tableaux VII, VIII, IX, X, XI et XII.

Technique générale.

Les recherches avec les bacilles furent faites en ajoutant aux diverses solutions 0 gr. 40 à 0 gr. 60 de bacilles frais, soigneusement lavés à l'eau stérile. Comme témoins, les mêmes essais étaient répétés avec des bacilles préalablement chauffés à 115°.

Les recherches avec le liquide de culture furent faites en ajoutant aux diverses solutions 10 à 15 cm^3 du liquide de culture neutralisé. Comme témoins, les mêmes essais étaient répétés avec le liquide chauffé à 115°.

Les solutions servant aux essais ont été faites avec de l'eau stérile et l'antisepsie des milieux était assurée par addition de fluorure de sodium (2%) ou de chloroforme et de toluène.

Les mélanges étaient laissés 6 à 8 jours à l'étuve à 37°, sauf pour la recherche des diastases lypolytiques dont l'action, plus rapide, fut observée au bout de 10 minutes ou de 1 heure.

Le dosage des sucres réducteurs a été effectué par la méthode de BERTRAND.

Pour la recherche des diastases protéolytiques, j'ai employé le titrage au formol, en me servant d'une solution de KOH N/10 et de phénolphtaléine comme indicateur ; le virage était poussé jusqu'à coloration rouge vif, ainsi que l'indique SŒRENSEN, et comparé d'ailleurs avec un liquide type de contrôle.

Formol employé (préparé pour chaque série d'expériences) :
100 cm^3 de formol du commerce,
1 cm^3 de sol. alcoolique de phtaléine à 1%,
+ KOH N. jusqu'à légère teinte rouge.

Liquide type de contrôle (occupant un volume sensiblement égal au volume moyen des solutions en essai) :
10 cm^3 d'eau distillée bouillie,
10 cm^3 du formol ci-dessus,
3 cm^3 de KOH N/10.
On titre en retour avec SO^4H^2 N/10 jusqu'à ce que le liquide ne présente plus qu'une teinte rose faible ; on ajoute alors IV gouttes de KOH N/10 pour faire prendre à la liqueur type une couleur rouge vif. — On tient compte dans les calculs de la quantité de KOH N/10 employée en excès sur la quantité de SO^4H^2 N/10.

Dosage — 10 cm³ du liquide à titrer,
10 cm³ du formol ci-dessus,
+ KOH N/10 jusqu'à ce qu'on ait atteint la couleur du liquide type de contrôle.

Les résultats sont exprimés en nombre de centimètres-cubes de KOH N/10 employés. En multipliant ces valeurs par le coefficient 1,4 on aurait la quantité correspondante d'Azote en milligrammes.

TABLEAU VII.

Action des bacilles et du liquide de culture sur les Sucres et les Polyoses.

Culture âgée de 24 jours développée sur milieu chimiquement défini avec glycérine.
Les examens ont été faits après 6 jours de séjour à l'étuve à 37°.

Sucres et **Polyoses** soumis à l'hydrolyse	**Recherches avec les bacilles**				**Recherches avec le liquide de culture**			
	Pouvoir réducteur		Pouvoir rotatoire		Pouvoir réducteur		Pouvoir rotatoire	
	avec bacilles stérilisés	avec bacilles non stérilisés	avec bacilles stérilisés	avec bacilles non stérilisés	avec liquide stérilisé	avec liquide non stérilisé	avec liquide stérilisé	avec liquide non stérilisé
Saccharose solution à 4% dans eau fluorée	0	0	+ 5°,51	+ 5°,51	»	»	+ 4°,5	+ 4°,4
Maltose (même solution)	1 cm³ précipite 42 mgr. 4 de Cu.	1 cm³ précipite 42 mgr. 4 de Cu.	+ 10°,29	+ 10°,30	»	»	+ 8°,27	+ 8°,25
Lactose (même solution)	1 cm³ précipite 53 mgr. 5 de Cu.	1 cm³ précipite 53 mgr. 6 de Cu.	+ 4°,18	+ 4°,18	»	»	+ 3°,39	+ 3°,39
Amidon empois à 2% dans eau fluorée	1)— 0	fluidification 5 cm³ ppitent 35 mgr. de Cu. Maltosazone	»	»	0	très légère réduction	»	»
	2)— 0	5 cm³ ppitent 27 mgr. de Cu.	»	»	0	— id —	»	»
Inuline solution à 2%	0	0	— 1°,55	— 1°,55	0	0	— 1°,29	— 1°,29
Eau fluorée (témoin)	0	0	+ 0°,06	+ 0°,06				

TABLEAU VIII.

Action des bacilles et du liquide de culture sur les Glucosides.

Culture âgée de 24 jours développée sur milieu chimiquement défini avec glycérine.
Les examens ont été faits après 6 jours de séjour à l'étuve à 37°.

Glucosides soumis à l'hydrolyse	Recherches avec les bacilles				Recherches avec le liquide de culture			
	Pouvoir réducteur		Pouvoir rotatoire		Pouvoir réducteur		Pouvoir rotatoire	
	avec bacilles stérilisés	avec bacilles non stérilisés	avec bacilles stérilisés	avec bacilles non stérilisés	avec liquide stérilisé	avec liquide non stérilisé	avec liquide stérilisé	avec liquide non stérilisé
Amygdaline solution à 0,25/50	0	très légère réduction de $Cu(OH)^2$	— 0°,18	— 0°,18	»	»	»	»
,, 0,50/50 dans eau fluorée	0		»	»	0	très légère réduction	— 0°,55	— 0°,52
Arbutine mêmes solutions à 0,25/50	0	légère réduction; le liquide a pris une teinte acajou	— 0°,60	— 0°,57	»	»	»	»
mêmes solutions à 0,50/50	0				0	légère réduction; le liquide a pris une teinte acajou pâle	— 1°	— 0°,95
Salicine solution à 0,50/50	0	20cm³ ppitent 9 mgr 2 de Cu.	— 1°,22	— 1°,16	»	»	»	»
Eau fluorée (témoin)	0	0	+ 0°,05	+ 0°,06	»	»	»	»

TABLEAU IX.

Action des bacilles sur les Ethers des acides gras.

Culture de 25 jours développée sur milieu défini avec glucose ou glycérine.

Ethers d'acides gras	Composition du mélange	Réaction CO^3Na^2 (en gouttes) nécessaire [1]) pour neutraliser après 10 min.	Réaction CO^3Na^2 (en gouttes) nécessaire [1]) pour neutraliser après 1 heure
Acétate d'éthyle 0,75 cm³ d'acétate 100 – d'eau	*a)* 15 cm³ de sol. d'acétate 1 goutte de phtaléine CO^3Na^2 j. coloration rose + bacilles (à 55°)	acide VI gouttes	
	b) Témoins avec bacilles chauffés	alcaline (color. rose)	
	b) Témoins sans bacilles	– id. –	
Butyrate d'éthyle 1 cm³ de butyrate 100 – d'eau (émulsionner par agitation)	*a)* 15 cm³ de sol. de butyrate 1 goutte de phtaléine CO^3Na^2 j. coloration rose + bacilles (à 55°)	acide XL gouttes	
	b) Témoin (avec bacilles chauffés)	alcaline	
Monobutyrine Solution aqueuse saturée (1% environ)	*a)* 20 cm³ de sol. de monob. 1 goutte de phtaléine CO^3Na^2 j. coloration rose + bacilles (à 37°)	acide XII gouttes	XLV gouttes
	b) Témoins avec bacilles chauffés	alcaline	VI –
	b) Témoins sans bacilles	– id. –	III –
Huile de ricin	*a)* 7 cm³ d'huile 4 – d'eau 4 – de SO^4H^2 N/10 + bacilles [2]) (à 37°)		1) XII gouttes 2) XV –
	b) Témoin		0

[1]) Solution de carbonate de sodium à 0,5%.

[2]) Après 1 heure de contact, le mélange est additionné de 25 cm³ d'alcool à 95°, on agite, ajoute quelques gouttes de phtaléine, puis 4 cm³ de NaOH N/10 pour saturer les 4 cm³ de SO^4H^2 N/10.

TABLEAU X.

Action des bacilles et du liquide de culture sur les Matières protéiques.

Culture âgée de 24 jours développée sur *milieu chimiquement défini* avec glycérine.

	Matières protéiques soumises à l'hydrolyse	Recherches avec le liquide de culture — Composition du mélange en expérience	Titrage au Formol — au début de l'expérience	Titrage au Formol — après 6 jours à 37°	Recherches avec les bacilles — Composition du mélange en expérience	Titrage au Formol — au début de l'expérience	Titrage au Formol — après 6 jours à 37°
en milieu acide	1° *Ovoalbumine* Solution à 4 % env. — 30 gr. blanc d'oeuf, 50 cm³ eau. Agiter et filtrer, neutraliser.	*a)* 20 cm³ sol. d'albumine + 10 » liq. de culture + 1,7 » HCl N. (acidité = 2 gr. HCl ‰)	9,45	9,45	*a)* 20 cm³ sol. d'albumine + 10 » d'eau + 1,7 » HCl N. + bacilles	6,3	6,5
		b) Témoin	9,35	9,35	*b)* Témoin	6,2	6,3
	2° *Peptone* Solution à 4 % — 4 gr. pept. Witte, 100 cm³ eau au B-M. 1 heure filtrer et neutral.	*a)* 20 cm³ sol. de peptone + 10 » liq. de culture + 1,7 » HCl N.	16	16,5	*a)* 20 cm³ sol. de peptone + 10 » d'eau + 1,7 » HCl N. + bacilles	11,6	12
		b) Témoin	15,9	16	*b)* Témoin	11,4	11,6
	3° *Caséine* Solution à 2 % — 2 gr. caséine, 40 cm³ HCl N/10, 60 cm³ eau, agiter	*a)* 20 cm³ sol. de caséine + 10 » liq. de culture (acidité = 0,95 HCl ‰)	7	7,45	*a)* 20 cm³ sol. de caséine + 10 » d'eau + bacilles	4	4,3
		b) Témoin	7,6	7,6	*b)* Témoin	4,1	4,25

TABLEAU X (suite)

Matières protéiques soumises à l'hydrolyse		Recherches avec le liquide de culture			Recherches avec les bacilles		
		Composition du mélange en expérience	Titrage au Formol au début de l'expérience	Titrage au Formol après 6 jours à 37°	Composition du mélange en expérience	Titrage au Formol au début de l'expérience	Titrage au Formol après 6 jours à 37°
en milieu alcalin	4° *Peptone* Solution à 4 % (comme 2°)	*a)* 20 cm³ sol. de peptone 10 » liq. de culture 0,45» NaOH N (alcalinité = 0 gr. 60 NaOH ‰)	6,1	8,3	*a)* 20 cm³ sol. de peptone 10 » d'eau 0,45» NaOH N + bacilles	2,6	4,4
		b) Témoin	6,2	6,8	*b)* Témoin	2,7	3
	5° *Caséine* Solution à 4 % — 4 gr. caseine 2 cm³ 25 NaOH N Eau q.s.p. 100 cm³	*a)* 20 cm³ sol. de caséine 10 » liq. de culture (alcalinité = 0 gr. 60 NaOH ‰)	4,5	6	*a)* 20 cm³ sol. de caséine 10 » d'eau + bacilles	1) 1,5 2) 1,7	4,3 6
		b) Témoin	4,5	5	*b)* Témoin	1,5	2,3
					30 cm³ eau 0,45 » NaOH N + bacilles non stérilisés		0,4

TABLEAU XI

Action des bacilles et du liquide de culture sur les Matières protéiques

Culture âgée de 30 jours développée sur *bouillon peptoné* glycériné.

Matières protéiques soumises à l'hydrolyse		Recherches avec le liquide de culture			Recherches avec les bacilles		
		Composition du mélange en expérience	Titrage au Formol au début de l'expérience	Titrage au Formol après 6 jours à 37°	Composition du mélange en expérience	Titrage au Formol au début de l'expérience	Titrage au Formol après 6 jours à 37°
en milieu acide	*Ovoalbumine* Solution à 4%	20 cm³ sol. d'albumine 10 » liq. de culture 1,7 » HCl N (acidité = 2 gr. HCl ‰)	8	8	20 cm³ sol. d'albumine 10 « d'eau 1,7 » HCl N + bacilles	6,4	6,6
en milieu acide	*Peptone* Solution à 4% (Pept. Chapoteaut)	15 cm³ sol. de peptone 15 » liq. de culture 1,7 » HCl N	14	14,2	15 cm³ sol. de peptone 15 « d'eau 1,7 « HCl N + bacilles	9,5	9,9
en milieu alcalin	*Peptone* Solution à 4% (Pept. Chapoteaut)	*a)* 15 cm³ sol. de peptone 15 » liq. de culture 0,45» NaOH N (alcalinité = 0 gr. 60 Na OH ‰)	1) 3,8 2) 3,7	5,7 5,2	*a)* 15 cm³ sol. de peptone 15 » d'eau 0,45» NaOH N + bacilles	1) 3 2) 3	5,2 5,5
		b) Témoin	3,7	4	*b)* Témoin	3,2	3,7

TABLEAU XII.

Action des bacilles et du liquide de culture sur l'Urée.
Culture de 25 jours développée sur milieu défini avec urée.

Composition du mélange	Réaction en cm³ de KOH $N/_{10}$ (sur 10 cm³ du mélange)		Titrage au formol (sur 10 cm³ du mélange)	
	au début de l'expérience	après 8 jours à 37°	au début de l'expérience	après 8 jours à 37°
a) 40 cm³ sol. d'urée à 4‰ 10 cm³ liq. de culture	0	0,3	0,2	0,45
b) Témoin (liq. de culture chauffé)	0	0,3	0,3	0,4
a) 40 cm³ sol. d'urée + bacilles	1) 0 2) 0	0,1 0,1	0 0	0,2 0,25
b) Témoin (bacilles chauffés)	0	0,1	0	0,2

De ces essais il ressort que, *dans les conditions expérimentales*, le bacille tuberculeux développé sur milieu défini à la glycérine ou sur milieu défini au glucose ne renferme ni sucrase, ni maltase, ni lactase. Le liquide de culture n'en renferme pas davantage.

Par contre le bacille, qu'il provînt du milieu avec glycérine ou du milieu avec glucose, a déterminé une fluidification nette de l'amidon déjà apparente au bout de 24 heures, avec production de maltose mis en évidence par le pouvoir réducteur et la formation de maltosazone ; mais je n'ai pas distingué de cristaux de glucosazone. — Deux essais successifs m'ont donné des résultats semblables, tandis que les témoins, avec bacilles stérilisés, n'ont pas varié. Il semble donc que le bacille tuberculeux laisse exsuder un peu d'amylase.

Mais il est dépourvu d'inulase car il demeure sans action sur l'inuline.

En ce qui concerne les glucosides, les résultats sont assez curieux : Avec l'amygdaline, je n'ai constaté qu'une très légère réduction que ne donnent pas les témoins, et la réduction est plus nette avec l'amygdaline soumise à l'action du liquide de culture qu'avec celle soumise à l'action des bacilles. Toutefois dans un cas comme dans l'autre le papier picro-sodé ne révèle pas de dégagement d'acide cyanhydrique.

Avec la salicine, la réduction est déjà appréciable : au bout de 5 jours, 0 gr., 50 de salicine ont subi en présence des bacilles une hydrolyse déterminant la mise en liberté de 0 gr., 011 de glucose.

Avec l'arbutine, on assiste à une hydrolyse très manifeste : alors que le liquide témoin avec bacilles stérilisés demeure incolore, le liquide avec bacilles vivants, quelle que soit leur provenance, prend une teinte acajou de plus en plus foncée par suite de la mise en liberté de l'hydroquinone. Même résultat avec les liquides de culture (milieu défini avec asparagine-glycérine, ou bouillon peptoné-glycériné). Si on ensemence le bacille sur un milieu à l'asparagine-glycérine additionné d'arbutine, il se développe et le milieu acquiert une coloration acajou qui s'accentue de plus en plus. — Pour inattendue que soit la présence d'arbutase dans le bacille tuberculeux, elle ne l'est pas davantage que celle de l'uréase par exemple chez l'escargot ou dans les pois de soja.

Goris expérimentant avec des bacilles tuberculeux cultivés sur bouillon n'obtint de même aucune hydrolyse du saccharose, du tréhalose, du maltose et du lactose. Ses recherches sur l'hydrolyse des glucosides se limitèrent à l'amygdaline et furent négatives (aucune odeur, et aucun changement dans le pouvoir rotatoire).

Le bacille tuberculeux hydrolyse les monoéthers. Déjà en 1901 Carriere avait signalé dans le bouillon peptoné glycériné qui avait servi de milieu de culture l'existence d'un ferment décomposant la monobutyrine en acide butyrique. — Avec des bacilles développés sur milieu défini au glucose ou à la glycérine j'ai constaté l'hydrolyse de l'acétate et du butyrate d'éthyle ainsi que de la monobutyrine. L'action est rapide et se manifeste déjà au bout de 5 minutes. Vis-à-vis des grais-

ses véritables (triglycérides), l'action est moins évidente, en tout cas plus lente ; elle parait presque nulle sur l'huile de ricin. Si le bacille tuberculeux possède donc de la monobutyrinase, il renfermerait peu de lipodiastase proprement dite.

Il contient un ou plusieurs ferments protéolytiques qui, dans les conditions expérimentales, n'agissent pas sur les protéines (albumines et globulines), mais sur leurs produits de dédoublement (albumoses et peptones) ainsi que sur les paranucléoprotéides (caséine), en milieu alcalin. — Il ne sécrète pas d'uréase.

Enfin il ne manifeste pas la présence de diastases oxydantes ni de zymase alcoolique, mais comme toutes les cellules vivantes il décompose l'eau oxygénée.

4.

TOXINES.

On a rapproché des diastases les substances plus ou moins toxiques excrétées par les microbes ou contenues dans le corps microbien. Ces poisons désignés sous le nom générique de toxines sont considérés en quelque sorte comme des diastases défensives. « Une toxine, dit Duclaux, peut être définie comme une diastase qui, au lieu d'agir sur une substance inerte, agit sur une substance contenue dans une cellule vivante et jouant dans la vie de la cellule un rôle physiologique plus ou moins accusé ».

Mais alors que les diastases, agissant comme catalyseurs physiologiques, produisent des transformations chimiques incontestables, l'essence du phénomène produit par les toxines nous est peu ou ne nous est pas connu. Déjà en 1889 Roux et Yersin écrivaient à propos de la toxine diphtérique : « il nous parait ressortir que le poison diphtérique a beaucoup d'analogie avec les diastases ; son activité est tout à fait comparable à celle de ces substances. Nous n'entendons pas dire cependant qu'elle produise des phénomènes d'hydratation semblables à ceux que causent les diastases ; elle n'interver-

tit point le sucre, ne digère point la fibrine ; si nous la comparons aux diastases, c'est sans préjuger son action chimique et seulement pour rappeler quelques unes de ses propriétés ». — D'autre part les accidents pathologiques, d'une façon générale, ne se manifestent pas immédiatement après l'injection d'une dose même élevée de toxine : il y a toujours en effet une période d'incubation alors que l'action des diastases est immédiate. — D'autre part encore les toxines apparaissent plutôt comme des déchets de la vie cellulaire destinés à être rejetés loin de la cellule à laquelle leur accumulation pourrait nuire, tandis que les diastases servent à l'utilisation directe des substances qui doivent entrer dans la nutrition. — D'autre part enfin les diastases ne se détruisent pas ou se détruisent très peu en agissant, et les toxines se détruisent.

Il est vrai cependant que les toxines présentent avec les diastases un certain nombre de propriétés communes : [1])

Comme les diastases elles sont douées de propriétés colloïdes ; en particulier elles ne dialysent pas ou dialysent très lentement et très imparfaitement, et se laissent englober et entraîner par les précipités floconneux qu'on détermine dans les liqueurs où elles existent ; elles sont affaiblies par la filtration. Comme les diastases elles sont solubles dans la glycérine, insolubles dans l'alcool qui les précipite de leur solution aqueuse ou glycérinée, et ce précipité, après dessication à basse température, se redissout dans l'eau.

Comme les diastases également elles provoquent des actions d'ordre catalytique, c'est-à-dire qu'elles sont capables, en quantité infiniment petite, de provoquer des transformations infiniment grandes. La disproportion entre les faits et la cause parait même encore plus grande avec les toxines parce qu'il suffit que celles-ci, en se répandant dans un organisme même volumineux, atteignent un certain nombre de cellules essentielles pour amener la maladie ou la mort. En réalité, du fait

[1]) Semblables affinités diastasiques se trouvent dans les antitoxines, agglutinines, précipitines etc.. qui sont autant de produits de réaction de la cellule organique impressionnée par les toxines. Toutefois alors que dans le cas des actions diastasiques l'état d'équilibre chimique terminal, c'est-à-dire le rapport des quantités de substance transformée et de substance non transformée, est à peu près indépendant de la quantité de diastase employée, pour les antitoxines au contraire l'état d'équilibre final dépend essentiellement de la quantité d'antitoxines utilisée.

que l'effet nocif ne s'exerce que sur certains éléments cellulaires dont il est difficile de déterminer le poids, il ne faut pas exagérer la disproportion entre la petitesse de la masse de l'élément actif et l'importance de l'effet produit ; souvent il ne peut y avoir qu'une trompeuse apparence dans le rapport entre le poids du toxique et le poids de l'animal tué.

Comme les diastases enfin elles résistent aux antiseptiques (alcool phénol...) et sont atténuées puis détruites par la chaleur (en général à une température inférieure à 100°). Toutefois alors que toutes les diastases sont détruites avant l'ébullition, certaines toxines microbiennes (tuberculine, malléine) comme certaines toxines végétales (abrine, ricine) résistent à l'action d'une température de 100°. Mais dans tous les cas l'action de la chaleur a partout la même marche : « pour les unes comme pour les autres, dit Duclaux, il n'y a pas de température mortelle, il y a une zone mortelle de températures sur laquelle s'établit une sorte de compensation entre le chiffre de la température et la durée de l'action. Cette zone n'est pas non plus caractéristique de la diastase ou de la toxine ; elle peut varier et même largement avec la composition du liquide, sa nature alcaline ou acide, la quantité et la qualité des sels contenus. »

Ces toxines peuvent être excrétées dans le milieu ambiant (exotoxines) ou bien être retenues à l'intérieur du microbe. (endotoxines), — de même que des diastases diffusent dans le milieu nutritif comme la sucrase (diastase exocellulaire), tandis que d'autres restent intimement unies au protoplasma de la cellule, comme l'alcoolase (diastase endocellulaire).

Et de même que les produits de la transformation diastasique exercent sur la fermentation une action inhibitrice croissant avec la quantité de produits de transformation, de même les toxines, produit d'excrétion, de désassimilation, ont une influence paralysante sur le développement du bacille. En effet alors qu'il reste encore dans le milieu artificiel des substances nutritives en quantité bien supérieure à celle qu'exige le développement, celui-ci s'arrête. Ce n'est donc pas faute de substances essentielles à la vie microbienne comme l'avait tout d'abord cru Pasteur, mais à cause de l'apport croissant de substances toxiques : il n'y a pas épuisement mais intoxication.

La nature du ou des principes actifs ainsi diffusés par le bacille tuberculeux dans les milieux de culture et auxquels sont dues les propriétés physiologiques des produits désignés sous le nom de « Tuberculines » n'est pas ou est encore peu connue. Il en est de même d'ailleurs pour tous les produits microbiens dénommés toxines, de même pour les venins, et d'une façon générale pour toutes les diastases, hormis les « complémentaires actives » que celles-ci renferment.

Koch en précipitant par l'alcool la tuberculine brute (c'est à-dire la culture totale sur bouillon peptoné glycériné, stérilisée à 105°, concentrée au 1/10 au bain-marie, puis filtrée sur papier) obtint un précipité floconneux qui, après dessication, abandonne une poudre blanc-jaunâtre, soluble dans l'eau et la glycérine, 40 fois plus active que la tuberculine brute dont elle à d'ailleurs les mêmes propriétés et qu'il nomma « tuberculine purifiée » (la purification peut être accentuée par une succession de précipitations par l'alcool après dissolution dans l'eau).

C'est un produit de nature albuminoïde mais très complexe, — ni albumose, ni peptone proprement dite, d'après Koch, mais voisin de ces corps. Ruppel puis Prudden et Hodenpyl attribuent, en partie au moins, les réactions provoquées par la tuberculine à une protamine spéciale (tuberculosamine de Ruppel) diffusant lentement des éléments bacillaires. Hammerschlag reconnait la complexité du poison sécrété par le bacille tuberculeux mais assigne à une toxalbumine la plus grande part de son action. C'est également l'opinion de Vaudremer qui ne fit aucune analyse chimique mais reconnut, au cours d'expériences sur l'attaque de la tuberculine par les moisissures et les bactéries, que ce sont surtout sinon exclusivement les microbes protéolytiques qui détruisent les pouvoirs toxiques de la tuberculine, tandis que les germes qui ne s'attaquent qu'à la peptone la laissent intacte ; et il conclut : « ceci pourrait faire penser que, selon toute probabilité, la tuberculine n'est autre chose qu'une toxalbumine existant comme un des éléments constituant le protoplasme du bacille de la tuberculose ». Tout cela est assez vague. Kuhne, plus précis, classe la substance spécifique de la tuberculine dans les albumoses et plus spécialement dans les deutéro-albumoses, con-

clusions partagée par Auclair et Paris. Pour Hunter et Mezernitskii elle contiendrait également des albumoses primaires (hétéro et proto-protéoses). C'est aussi à cette idée de la nature albumosique de la toxine que semble se rallier Baudran.

A. Gautier à propos de la tuberculine purifiée de Koch, c'est-à-dire de la tuberculine précipitée provenant de cultures sur bouillon peptoné, écrit qu'elle possède toutes les réactions générales des matières albuminoïdes : réactions de précipitation et réactions de coloration (réactions du biuret, de Millon, d'Adamkiewicz, xanthoprotéique) et il conclut que « toutes ces propriétés font notoirement de la tuberculine une albuminoïde se rapprochant particulièrement de la caséine ». Mais les résultats positifs de ses recherches n'ont qu'une signification très relative. S'il n'est pas douteux en effet que les bacilles diffusent des toxines solubles, c'est-à-dire des produits de désassimilation qui résultent des phénomènes biologiques dont le bacille est le siège, et si ces toxines donnent les réactions protéiques, ce ne sont pas du moins les essais chimiques faits sur une telle tuberculine qui permettent de bien l'établir, car le bouillon peptoné non ensemencé m'a donné dans les mêmes conditions d'expérience (précipitation du bouillon par l'alcool et redissolution du précipité dans l'eau) des réactions identiques. Pour certifier que les réactions observées sont dues aux seules toxines excrétées, il faudrait être sûr que les bacilles au cours de leur développement aient décomposé la totalité des matières albuminoïdes contenues dans le bouillon, ce que l'on ne peut vérifier. Dans le chapitre précédent j'ai dit que l'analyse d'un tel milieu, si méthodique soit-elle, ne peut fournir des renseignements précis.

Tentée par Bouveault dans le but précisément d'étudier les modifications que pouvait faire subir au bouillon la culture du bacille de la tuberculose aviaire, cette analyse donna des résultats nullement en rapport avec le travail qu'une telle recherche avait nécessité. Du reste Bouveault à cause des difficultés rencontrées souhaite à la fin de son étude trouver « un bouillon de culture artificiel exempt de matières albuminoïdes afin de pouvoir en extraire les toxalbumines que le microbe y a élaborées ».

Pour que les résultats aient une valeur absolue il est nécessaire en effet d'opérer avec un milieu d'une constitution chimique bien connue et dans lequel l'azote en particulier est fourni par un corps défini, de poids et de propriétés déterminés : ces conditions déjà intéressantes pour l'étude de la biologie même du bacille présentent une importance toute spéciale en ce qui concerne l'obtention d'une tuberculine exempte d'albumine hétérogène.

En ensemençant un milieu indiqué par Proskauer et Beck et qui contenait seulement de l'asparagine comme seul corps azoté, Lockemann constata qu'au bout de 4 semaines de végétation de bacilles tuberculeux le liquide filtré donnait les réactions des protéines nettement positives. Par contre Lœvenstein et Pick ayant étudié les caractères de la tuberculine fabriquée par des bacilles ensemencés sur leur milieu (qui renferme comme substances azotées de l'asparagine et du lactate d'ammonium) prétendent n'avoir pas obtenu les réactions générales des substances protéiques même après concentration du liquide filtré jusqu'à consistance sirupeuse. Ils considèrent la tuberculine comme un produit de désintégration des matières albuminoïdes et la rangent dans le groupe des polypeptides décrit par Fischer, bien que, contrairement aux polypeptides jusqu'ici étudiés, elle soit détruite par la pepsine et résiste à l'action de l'érépsine.

J'ai fait des recherches en cultivant le bacille sur le milieu chimiquement défini indiqué page 24. — Les résultats avant et après culture sont consignés dans le Tableau XIII.

TABLEAU XIII.

Produits excrétés par le bacille dans le milieu de culture.

Nature des Recherches	Liquide témoin non ensemencé	Liquide de Culture 25 jours après l'ensemencement (La culture est séparée par filtration sur coton et le liquide est filtré ensuite à travers une bougie par aspiration à la trompe)	
Couleur et Aspect. . .	Incolore et limpide	Couleur jaune pâle – Limpide	
Odeur	Néant	Aromatique (odeur de mimosa).	
Reaction	Acidité = 16 cm³ Liq. N. °/₀₀	Acidité = 5 cm³ Liq. N. °/₀₀	
Examen microscopique		Absence de bacilles	
Réactions des Matières protéiques :			
Action de la chaleur en milieu acétique — Sur le liquide tel quel	Néant	Coagulation	
Action de la chaleur en milieu acétique — Après addition de chlorure de sodium . . .	Néant	Coagulation, avec précipité plus abondant	
Réactions de précipitation — Addition de :			Liquide filtré après coagulation par la chaleur
Acide azotique . . .	Neant	Précipité	Trouble disparaît à chaud
Ferrocyanure de potassium + acide acétique	Néant	id.	id.
Acide silicotungstique	Néant	id.	léger trouble
Reactif d'Esbach . .	Néant	id.	id.
— de Tanret . .	Néant	id.	id.
— de Brucke .	Néant	id.	id.
Tanin acetique . . . (tanin d'Almen)	Néant	id.	
Acétate de cuivre . . (solut. aq. saturée)	Coloration bleue	Coloration verdâtre avec léger coagulum	Léger précipité. Le filtrat donne la réaction du biuret.
Sulfate d'ammonium à saturation . . .	Néant	Précipité	Trouble, en milieu acétiq.
Sulfate d'ammonium à ½ saturation . .	Néant	Trouble	
Sulfate de magnesium à saturation . . .	Néant	id.	

TABLEAU XIII (suite)

Nature des Recherches	Liquide témoin non ensemencé	Liquide de Culture 25 jours après l'ensemencement	
Addition de:			Liquide filtré après coagulation par la chaleur
Sulfate de magnésium à saturation, puis chauffage du filtrat	Néant	Précipité	
Alcool absolu	Néant	id.	
Réaction du biuret . .	Teinte violacée[1])	Légèrement violacé	Légèrement violacé
» de Millon . .	Précipité blanc	Abondant précipité jaune-rosé	Précipité blanc
» xanthoprotéique	Néant	Positive	
» d'Adamkiewicz (ou glyoxylique)	Néant	Anneau légèrement violacé	
Divers:			
éduction de la liqueur cupro-alcaline	Négative	Négative	
éactions des sucres . .	Négatives	Négatives	
éactions de la cholestérine (effectuées sur le chloroforme avec lequel on a agité le liquide de culture)	Négatives	Négatives	
éaction de la murexide (Dérivés puriques)	Négative	Négative	
vec quelques cm³ du distillat:			
) réduction de l'anhydride chromique en présence de l'ac. sulfurique . . .	Négative	Positive	
) production d'iodoforme en présence d'iode et de soude	Négative	Positive	

[1]) La réaction du biuret donne: avec *l'asparagine*, une teinte violette qui est encore très appréciable à la dilution de 0,20 p. 1000. (A noter que l'asparagine n'a qu'un groupement amidé, bien que d'après SHIFF la réaction du biuret appartienne à toute substance possédant deux groupements amidés); avec *l'acide aspartique*, une teinte bleue puis un précipité bleu verdâtre clair, le liquide demeurant légèrement azuré.

De ces essais il résulte que le bacille tuberculeux excrète bien dans le milieu où il végète des substances protéiques, mais ce ne sont pas uniquement des protamines comme l'avait pensé RUPPEL, ni uniquement des albumoses, les unes et les autres n'étant pas coagulables par la chaleur.

Par contre la diffusion des protéines parait nette : les réactions de précipitation et de coloration des albumines sont toutes positives et le trouble déterminé par le sulfate d'ammonium à demi-saturation indique les globulines.

En outre le liquide filtré après coagulation par la chaleur se trouble quand on l'acidule avec l'acide azotique en présence de chlorure de sodium et ce trouble disparait à chaud ; il se trouble de même par addition de ferrocyanure de potassium et d'acide acétique, trouble qui disparait également à chaud ; avec les divers réactifs des alcaloïdes il donne aussi un léger trouble. Il y a donc présence de protéoses, mais limitée aux albumoses et à l'exclusion de peptones : en effet le liquide débarrassé des albumoses par le sulfate de magnésium à saturation et l'acide acétique ne donne plus la réaction du biuret, encore sensible pourtant avec une solution de peptone au 1/100 000e.

Quant aux albumoses, elles sont à la fois primaires et secondaires puisque la réaction de l'acétate de cuivre est positive et que le liquide filtré après précipitation par l'acétate cuivrique donne la réaction du biuret.

Cette réaction du biuret n'est pas due à l'asparagine. Nous avons vu en effet qu'après 25 jours de culture ce corps avait subi l'hydrolyse totale de son groupement amidé, et l'acide aspartique n'est pas biurétique. D'ailleurs la réaction du biuret est négative après précipitation des albumoses, ce qui prouve que toute cause d'erreur imputable à l'asparagine peut être éliminée.

La réaction glyoxylique est légèrement positive, ce qui indique la présence du noyau pyrrolique existant dans le tryptophane et caractéristique de l'indol, bien que le bacille tuberculeux soit classé parmi les bacilles ne produisant pas d'indol. La caséine, de laquelle A. GAUTIER rapproche la tuberculine, donne cette réaction avec une très grande intensité.

Légèrement positive aussi est la réaction de Millon, caractéristique de la tyrosine.

Il est remarquable que la bacille puisse fabriquer des corps compliqués comme le tryptophane par exemple, alors que le mécanisme de la dégradation de l'asparagine ne permet pas d'en prévoir la formation. D'ailleurs, d'une façon générale, si l'on peut expliquer les processus d'analyse et de dégradation que la cellule bactérienne opère sur les aliments qui lui sont offerts, et s'il nous est possible d'établir ainsi des schémas se rapportant à sa fonction énergétique, par contre sa fonction synthétique est très malaisée à étudier et nous demeure inconnue.

Peut-être certaines réactions des matières albuminoïdes seraient-elles plus nettes encore en filtrant simplement sur coton le liquide et sa culture, car la bougie peut retenir une partie des colloïdes ; mais je tenais à opérer sur un liquide parfaitement privé de bacilles. D'ailleurs ce liquide a une réaction acide très faible et d'autre part contient des sels (SO^4Mg), facteurs qui, d'après les recherches de Holderer sur les diastases confirmées par celles de Aubel et Colin sur les toxines, favorisent la filtration des solutions colloïdales à travers les bougies.

Je n'ai pas trouvé trace de dérivés puriques, — ni de cholestérine, corps que Baudran aurait mis en évidence dans la tuberculine brute de Koch en additionnant celle-ci d'alcool qui précipite les matières albuminoïdes, puis en épuisant par l'éther le dépôt blanc restant après distillation de l'alcool : il obtint ainsi de la cholestérine et le produit aromatique de la tuberculine. Ce produit serait, pour Baudran, un hydrate de cholestérine analogue à la terpine. On sait que l'éther-oxyde interne de l'hydrate de terpilène, comme d'ailleurs de nombreux carbures du groupe des terpènes, se rencontre abondamment dans les essences végétales. — En tout cas, en traitant le liquide de culture comme Baudran avait traité la tuberculine brute de Koch je n'ai pu isoler de cholestérine. Il est vrai que les deux liquides n'étaient pas identiques puisque celui sur lequel j'opérais n'avait subi aucune réduction à chaud en présence des bacilles, et de plus la culture était peu âgée (25 jours). Mais j'avais expérimenté ainsi à dessein, préférant

faire mes essais avec une culture jeune pour n'avoir que des produits d'excrétion de bacilles vivants et non pas, comme dans les cultures anciennes, des produits d'autolyse ou de transformation ; — et pour la même raison je n'ai ni stérilisé à l'autoclave ni réduit au bain-marie le liquide avec sa flore microbienne.

CHAPITRE III.

CONSTITUTION CHIMIQUE DU BACILLE TUBERCULEUX. SES VARIATIONS.

HISTORIQUE.

C'est Hammerschlag qui, le premier, en 1888, signala la richesse particulière du bacille tuberculeux en substances grasses analogues aux cires : environ 27 gr. pour 100 gr. de bacilles secs, c'est-à-dire une proportion que ne présente aucun autre microbe, et que confirmèrent les analyses de Weyl datant à peu près de la même époque. — Dès lors, les recherches sur les constituants du bacille se multiplièrent, plus ou moins approfondies, les unes limitées de préférence à l'étude des matières grasses — ce sont les plus nombreuses —, les autres à celle des matières albuminoïdes, certaines plus rares s'étendant à la composition complète du bacille.

Matières grasses. —

Hammerschlag et Weyl avaient trouvé que la quantité de matières grasses représentait 27 p. 100 du poids sec. C'est également le taux donné par Ruppel, et par Aronson avec certaines cultures ;— sensiblement aussi celui obtenu par Klebs. D'autres auteurs indiquent une proportion plus élevée : 31 à 32 p. 100 (Levène) ; 33 à 34 p. 100 (Auclair et Paris ; Allilaire et Fernbach) ; 39 p. 100 (Kresling) ; 40 p. 100 (Bulloch et Mac Leod) ; 37 à 42 p. 100 (de Schweinitz et Dorset); 36 à 44 p. 100 (Baudran), etc...

Ces différences peuvent provenir de l'origine des bacilles analysés : ainsi de Schweinitz et Dorset ont constaté que les bacilles d'origine humaine cèdent à l'éther un taux de matières grasses plus élevé (28,77 p. 100) que les bacilles des variétés

bovine, chevaline et surtout porcine (12,50 p. 100, avec cette dernière) ; par contre la variété humaine donnerait le poids d'extrait alcoolique le plus bas.

Pour une même variété et une même race l'âge interviendrait également, et Aronson indique une variation de la quantité des matières grasses oscillant, selon l'âge de la culture, entre 8 à 10 gr. et 20 à 26 gr. pour 100 gr. de bacilles secs.

Mais les différences peuvent aussi être dues, du moins pour une grande part, à la nature des solvants et aux procédés d'extraction utilisés. En effet les bacilles furent soumis à l'action tantôt d'un seul parmi les divers solvants des graisses, tantôt de plusieurs d'entre eux employés successivement, et l'extraction fut faite tantôt à froid, tantôt à chaud soit par digestion ou ébullition, soit par des épuisements dans des appareils du genre Soxhlet. — D'une façon générale la masse bacillaire ne fut pas au préalable pulvérisée.

Hammerschlag traita par un mélange d'alcool et d'éther les bacilles lavés et séchés.

Aronson utilisa de même un mélange d'alcool et d'éther, auquel il ajouta de l'acide chlorhydrique dans la proportion de 1 pour 100 pour faciliter la séparation des graisses. — D'ailleurs, bien avant lui, Borrel et Roux avaient signalé que l'on pouvait arriver à dégraisser totalement les bacilles en les traitant d'abord par une solution faible d'acide chlorhydrique portée à l'ébullition, puis en les épuisant par le xylol à chaud après les avoir desséchés. Ces deux savants ajoutaient que l'action préalable de l'acide pouvait être remplacée par le chauffage à sec, au four à flamber, vers 140—150°. — Nægeli et Lœw avaient déjà constaté que lorsqu'on prenait la précaution de détruire par l'acide chlorhydrique concentré les parois des cellules de levure avant de les traiter par l'éther, on obtenait, sous forme d'acides gras, deux ou trois fois plus de graisses que dans l'ébullition avec de l'éther. D'après ces derniers auteurs, le rôle de l'acide minéral consisterait à rendre perméable à l'éther la membrane cellulaire de la levure. Mais il semble qu'il doit plutôt y avoir une hydrolyse véritable portant sur les combinaisons de la matière grasse avec les protéines et les hydrates de carbone.

De Schweinitz et Dorset employèrent l'éther seul. Klebs également. Bulloch et Mac Leod soumirent les bacilles à l'action successive de l'alcool méthylique, de la benzine et du chloroforme, — ou encore à l'action de l'alcool méthylique puis du mélange d'Aronson.

Levene se servit de l'alcool, de la benzine et du toluène ; l'alcool et l'éther ne dissolvant pas entièrement, dit-il, les graisses du bacille. Kresling épuisa dans un appareil Soxhlet la masse bacillaire séchée à 40°, soit successivement par l'éther, le chloroforme et l'alcool, en faisant varier d'ailleurs l'ordre de ces solvants, — soit par le chloroforme seul qui lui paru être le meilleur dissolvant des matières grasses.

C'est également à l'emploi successif de l'alcool, de l'éther et du chloroforme qu'eurent recours Auclair et Paris pour épuiser les bacilles ; ces trois solvants sont donnés par les auteurs comme nécessaires et suffisants. Ils ajoutent que l'éther de pétrole (utilisé par Vallée dans un appareil à oscillations contenant des billes de verre, — et employé aussi par Babès et Cantacuzène dans un tube Soxhlet) laisserait inattaqués les deux-tiers environ de la graisse cireuse.

Deycke Pascha et Reschad Bey firent l'épuisement avec du xylol, de la benzine et de l'éther de pétrole, et obtinrent une graisse à aspect cireux. Fontès n'employa que le xylol.

Allilaire et Fernbach utilisèrent un mélange de chloroforme et d'éther.

Baudran a mis en œuvre trois méthodes. Deux s'appliquèrent à des bacilles morts : 1) la méthode à l'acide chlorhydrique qui consiste en une digestion des corps microbiens à 50° pendant 8 à 10 jours avec 20 à 25 fois leur poids d'acide chlorhydrique à 1 p. 100 ; au bout de ce temps, on laisse refroidir et on sépare mécaniquement la partie surnageante qui renferme les graisses et la lécithine mais non la cholestérine ; celle-ci est retirée des bacilles dégraissés par un mélange d'éther et de benzine ;— 2) la méthode des épuisements dans un appareil Soxhlet au moyen de l'alcool absolu puis du xylol : toutes les matières grasses y compris la cholestérine sont ainsi obtenues. 3) Une troisième méthode fut employée par Baudran avec les bacilles vivants : il les épuise d'abord à froid par le chloroforme

qui enlève la cholestérine, puis par le mélange d'éther et de benzine qui dissout la lécithine et les graisses.

Ces divers travaux sont loin d'apporter d'égaux renseignements sur les constituants des graisses du bacille tuberculeux. Souvent les recherches se sont bornées à l'extraction de la matière grasse globale sans détermination analytique, ou bien les auteurs ont constaté seulement les analogies chimiques plus ou moins définies que présentent les substances isolées, et certains n'ont abordé l'étude détaillée que de quelques unes d'entre elles.

Klebs avait distingué dans les matières grasses du bacille une graisse rougeâtre fusible à 42° soluble dans l'éther, et une graisse blanche fusible au-delà de 50° insoluble dans l'éther mais soluble dans la benzine. Plus précis, Hammerschlag caractérisa de la tripalmitine et de la stéarine ainsi que de la lécithine.

De Schweinitz et Dorset signalèrent, outre l'acide palmitique, de l'acide arachidique et de l'acide laurique ainsi que des acides volatils. — Dorset et Emery ont de plus constaté qu'une partie des matières grasses n'était pas saponifiable et avait les caractères d'un alcool de la série grasse à poids moléculaire élevé. Deycke Pascha et Reschad Bey firent la même constatation.

Levène fixe comme point de fusion des substances grasses 50° à 60° et comme composition $C^{12}H^{24}O^3$. Il n'a pu en obtenir la saponification complète ni par la soude ni par l'éthylate de sodium, ni en les traitant par l'hydrate de baryte et les chauffant pendant 3 heures à 125°.

Kresling donne la composition approximative suivante de l'extrait chloroformique qu'il obtint, extrait de couleur brun foncé, à odeur aromatique et de consistance de la cire d'abeille :

Acides gras libres	14,4 %
Corps gras neutres et éthers d'ac. gras .	77,25
Lécithine	0,16
Cholestérine	indéterminée
Substances solubles dans l'eau . . .	0,73
Alcool retiré des éthers gras . . . . (point de fusion : 43°,5 — 44°)	39,10
Acides gras (point de fusion : 53°,5) . .	indéterminés
Produits formés au cours de la saponification des matières grasses . . .	25,76

et comme constantes :

Point de fusion	46°
Indice d'acidité	23,08
— de Hehner . . .	74,23
— de Reichert-Meissl .	2.
— de saponification .	60,70
— d'étherification .	37,62
— d'iode	9,82

Bulloch et Mac Leod, qui opérèrent sur plusieurs kilogr. de bacilles provenant des cultures employées dans la préparation de la tuberculine, isolèrent de la matière grasse une substance blanche qui spontanément précipite lorsqu'on laisse refroidir les liquides d'épuisement (alcool méthylique et mélange d'Aronson). Cette substance traitée par la potasse alcoolique se saponifie difficilement donnant un résidu blanc qui serait un alcool supérieur et, dans la solution potassique, un acide gras indéterminé. La saponification du reste de la matière grasse, obtenu par évaporation du liquide extracteur, a mis en liberté les acides isocétique, myristique, laurique, palmitique et aussi de l'acide oléique. A côté des graisses neutres existeraient également des acides gras libres (principalement palmitique et laurique), de la lécithine et autres graisses phosphorées.

Baudran mentionne aussi la présence de l'acide oléique. Voici d'ailleurs la composition qu'il donne des substances grasses du bacille tuberculeux :

Stéarine	15 à 18 gr.
Oléine	10 à 12 gr.
Lécithine distéarique .	6 à 7 gr.
Cholestérine . . .	5 à 7 gr.

soit au total 36 à 44 gr. de substances grasses pour 100 gr. de bacilles secs.

En outre il a dû trouver de l'acide palmitique puisque, par ailleurs, il parle de margarine.

Aronson indique, sans les identifier, l'existence d'acides gras libres (17 p. 100 de matières grasses) solubles dans l'alcool, — la partie non soluble devant être considérée comme une cire : elle est incomplètement saponifiable par la potasse, laissant un résidu soluble dans l'éther et qui, traité par l'anhydride acétique bouillant, s'éthérifie.

Auclair et Paris signalent de même, sans les caractériser davantage, des acides gras, des graisses neutres, de la lécithine, de la cholestérine, des substances cireuses.

Fontès a précipité de la solution xylolique par addition d'alcool un produit blanc jaunâtre fondant à 53°,5 et qu'il considère comme une cire. Il a extrait en outre des alcools supérieurs parmi lesquels il a déterminé de la cholestérine, de l'isocholestérine, de la phytostérine.

La *lécithine* est mentionnée par Hammerschlag, Kresling, Bulloch et Mac Leod, Baudran, Auclair et Paris. — Baudran, qui la précipita de la solution xylo-alcoolique ou éthéro-benzolique des matières grasses par addition d'acétone, spécifie que c'est une lécithine distéarique. Mais Sakæ Tamura, qui fit paraître une étude minutieuse sur certains composants du bacille tuberculeux, déclara que le phosphatide qu'il avait également isolé des graisses bacillaires n'avait pas la constitution de la lécithine. La proportion d'azote et de phosphore qu'il trouva fut en effet respectivement 2,69 et 2,98 pour 100, alors que la lécithine distéarique renferme 1,73 d'azote et 3,84 de phosphore pour 100, et sans entrer plus avant dans le détail de sa molécule il conclut que ce corps serait un diaminophosphatide.

La plupart des auteurs ont signalé l'aspect et les caractères de cire présentés par les graisses du bacille, ainsi que la difficulté de les saponifier complètement, – et certains d'entre eux mentionnent même un alcool de la série grasse à poids moléculaire élevé, mis en évidence par la saponification de la matière cireuse. Cet insaponifiable ne serait pas ou du moins pas entièrement de la cholestérine. Ce sont encore les travaux de Sakæ Tamura qui apportent sur ce sujet le plus de précision. Voici la technique qu'il employa :

Les bacilles, après épuisement par l'alcool-éther, sont mélangés à de l'acide sulfurique à 66 pour 100 qui les détruit. Le liquide épais et brunâtre ainsi obtenu, versé dans l'eau, laisse se déposer un précipité blanc floconneux qui est recueilli, lavé à l'eau et séché dans le vide. Ce produit est à son tour épuisé à l'alcool-éther puis chauffé 14 heures avec de l'acide sulfurique à 25 pour 100 : à la surface de la solution sulfurique apparait alors une matière huileuse qui par refroidissement se prend en masse. Elle est dissoute dans l'éther et, après évaporation du solvant, purifiée par dissolution dans la benzine,

puis cristallisations répétées dans l'alcool bouillant. Finalement il reste une poudre blanche, fondant à 66°, que TAMURA a appelé « *Mykol* » [1]). Sa composition centésimale serait C = 82,46 p. 100, H = 13,58 p. 100 ; et sa formule $C^{29}H^{56}O$. Il est facilement soluble dans l'éther, l'éther de pétrole, le chloroforme, la benzine, le xylol et le toluène ; plus difficilement soluble dans l'alcool et l'alcool méthylique. Comme le cholestol et le lupéol (alcools retirés l'un de l'écorce de quinquina, l'autre du lupin), il donne un dérivé bromé de substitution $C^{29}H^{55}BrO$ bien cristallisé ; il fournit également un acétate et un benzoate. Tel serait l'alcool supérieur de la série grasse antérieurement signalé par divers auteurs mais non caractérisé.

Sur la présence de la *cholestérine*, l'accord est loin d'être établi. KRESLING la mentionne sans donner de chiffre. AUCLAIR et PARIS disent en avoir isolé « une quantité importante » dans l'épuisement des bacilles avec le chloroforme : « la solution chloroformique est évaporée à siccité, le résidu est repris par l'alcool-éther bouillant et la cholestérine cristallise par refroidissement en longues aiguilles brillantes ».

BAUDRAN fixe un taux assez élevé (5 à 7 gr. pour 36 à 44 gr. de matières grasses). Dans sa méthode de digestion des bacilles avec l'acide chlorhydrique dilué, après avoir enlevé la partie surnageante et qui renferme les graisses et la lécithine, BAUDRAN reprend les bacilles lavés et séchés par un mélange d'éther et de benzine et obtient la cholestérine. « Elle a, dit-il, des réactions spéciales : c'est plutôt de l'isocholestérine se comportant comme un hydrate de terpène ; en effet, traitée à froid par parties égales d'acide azotique et d'alcool, elle donne l'odeur du terpinol et des cristaux de terpine qu'il est facile d'identifier.» J'ai rappelé dans le chapitre II que, d'après l'auteur, ce même dérivé de la cholestérine se formerait dans les cultures par oxydation lente en présence de l'air. Dans sa méthode par épuisements, la cholestérine se déposerait après addition d'acide acétique aux liquides extracteurs refroidis.

Enfin nous avons vu que FONTÈS, parmi les alcools supérieurs qu'il a extraits, a déterminé également de la cholestérine, de l'isocholestérine et de la phytostérine.

[1]) S. TAMURA, avait isolé le même produit du *Mykobacterium lacticola perrugosum.*

Par contre Hammerschlag ne signale pas de cholestérine. Aronson n'a pu l'identifier dans le résidu insoluble qu'il recueillit après saponification de la cire bactérienne ; — et pas davantage Panzer ne put la caractériser dans la combinaison qu'il obtint au moyen de la digitonine selon la méthode de Windaus. Quant au mykol de Tamura, il n'a aucune des réactions colorées de la cholestérine.

Matières albuminoïdes. —

En traitant à chaud des bacilles tuberculeux (développés sur gélose glycérinée) par de la soude diluée, Weyl constata qu'une partie se dissolvait tandis qu'il se précipitait des filaments blanchâtres insolubles. — La solution, en refroidissant, forme une matière gélatineuse, et cette matière redissoute dans de l'eau alcaline fournit, par addition d'acide, un précipité qu'une ébullition prolongée avec l'alcool et l'éther rend parfaitement blanc et qui renferme : Az. 4,4 p. 100 ; H. 7,3 p. 100 ; C. 51,6 p. 100. Ce corps, non réducteur, très soluble dans les alcalis, n'est pas attaquable par la pepsine et l'acide chlorhydrique ni par les acides dilués. Pour Weyl il serait analogue à la mucine et il l'appelle « *toxomucine* », sans d'ailleurs être très affirmatif sur son existence réelle dans les bacilles avant toute action des réactifs. — Quant aux filaments blanchâtres ils sont également de nature azotée et renfermeraient en outre du soufre ; ils ne se dissolvent que très lentement dans l'acide sulfurique concentré et correspondraient à la membrane du bacille, la partie gélatineuse correspondant au protoplasme.

Kresling ne spécifie pas la nature des substances azotées : dans la composition du bacille, il indique simplement la proportion de 8 gr. ,75 d'azote pour 100 gr. de masse microbienne séchée à 40°.

Pour Klebs, la matière albuminoïde du bacille serait une nucléine. — C'est aussi la conclusion de Giaxa et Gioffreddi.

Ruppel ayant longuement broyé des bacilles avec de l'eau, puis analysant le liquide laiteux séparé par centrifugation reconnut qu'il ne renfermait pas d'albumine coagulable mais des protéides et en isola une base exempte de phosphore, précipitable par le picrate de sodium en solution neutre, précipitant elle-même les albumoses en solution ammoniacale et ne donnant

que la réaction du biuret, — caractères que Kossel attribue aux protamines, aussi Ruppel appelle-t-il cette nouvelle protamine bacillaire « *tuberculosamine* ». Elle serait unie dans le bacille à un acide nucléique contenant 9,42 de phosphore pour 100, acide très toxique auquel il donne le nom d'« *acide tuberculinique* » et qui serait pour Behring le véritable principe actif de la tuberculine. Voici d'ailleurs l'analyse de Ruppel :

Graisses et cire	26,5 p. 100
Nucléoprotéide	23
Protamine (tuberculosamine) .	24,5
Ac. tuberculinique	8,5
Protéoïdes (kératine)	8,3
Cendres	8,2

Levène trouva que les bacilles renfermaient comme acides nucléiques, à la fois libres et combinés, non seulement de la cytosine et son dérivé d'oxydation l'uracile, mais aussi de la thymine (et à ce point de vue ils se comporteraient comme une cellule animale).

Auclair et Paris ont isolé par macération des bacilles dans l'eau distillée à 38°, puis dans une solution de chlorure de sodium à 10 pour 1000 à la même température, des albumoses et une quantité très faible d'albumines et de globulines. D'autre part ils précipitèrent une paranucléoalbumine (qu'ils appellent « *bacillo-caséine* »[1]) en traitant par l'acide acétique cristallisable à une température de 80° la masse microbienne privée des matières grasses, puis en ajoutant de la soude à la solution acétique obtenue. Cette paranucléoalbumine constituerait la substance protoplasmique du microbe. Les auteurs ne donnent aucun pourcentage de ces diverses matières albuminoïdes.

Baudran en neutralisant par la potasse le liquide chlorhydrique dans lequel il avait mis à digérer les bacilles, précipita de la nucléine : 3 à 4 gr. pour 100 gr. de bacilles secs ; et le reste de la solution contiendrait encore 53 à 54 gr. de matières albuminoïdes pour 100.

S. Tamura ayant traité par de l'acide sulfurique à 5 pour 100 les bacilles épuisés à l'alcool-éther obtint une dissolution acide qui, versée dans l'eau, abandonne un dépôt riche en aminoacides : il identifia ainsi de l'arginine, de l'histidine, de la lysine,

[1]) Pour Fontès la bacillo-caséine d'Auclair constituerait les granulations qui, dans le bacille, restent colorées par la méthode de Gram.

de la phénylanine, de la proline, de la tyrosine, du trytophane. Dans la solution il caractérisa en outre de l'adénine et vraisemblablement de l'hypoxanthine. Il n'a pu obtenir la tuberculosamine de Ruppel.

Hydrates de carbone. —

Dans les travaux parus sur la composition du bacille tuberculeux, il est peu fait mention d'hydrates de carbone.

Panzer, en traitant les bacilles par l'eau chaude a isolé un corps qui ressemble à la gomme arabique. Une solution concentrée de ce corps, faite à chaud, abandonne par refroidissement une substance gélatineuse ne contenant ni azote, ni phosphore, ni soufre ; elle est précipitée par l'alcool et l'acétate de plomb, donne la réaction de Molisch au naphtol, et réduit après hydrolyse la liqueur cupro-alcaline ; l'oxydation par l'acide azotique ne produit pas d'acide mucique mais de l'acide oxalique et l'auteur conclut à la présence d'une pectine qui ne serait pas une galactane.

A propos de la nature de la membrane ou de la « trame » du bacille, la cellulose a été citée par quelques auteurs, — en particulier par Hammerschlag.

Baudran, dans l'exposé de sa méthode à l'acide chlorhydrique, dit qu'après avoir retiré de la masse bacillaire les graisses et la cholestérine il eut, comme produit restant, de la cellulose se colorant par le chlorure de zinc iodé ; « seulement cette cellulose microbienne, cuticulaire, incrustée de substances minéralisées (silice, calcium) résiste à l'action de l'amylobacter ».

De même d'après Auclair et Paris, la matière bacillaire, débarrassée des matières grasses et des matières albuminoïdes selon les techniques indiquées par ces auteurs et que j'ai précédemment rappelées, ne renfermerait plus que de la cellulose présentant les réactions chimiques caractéristiques de cette substance.

Alcaloïdes. —

En épuisant les bacilles tuberculeux par l'alcool, Auclair et Paris ont dissout des substances alcaloïdiques qu'ils séparèrent au moyen du réactif phosphotungstique et qui leur donnèrent avec le chlorure de platine des sels doubles bien caratérisés.

Baudran isola aussi « une variété d'alcaloïde dont la toxicité est telle que 1 centigr. tue en 40 heures un cobaye de poids moyen ». Il l'obtint en faisant digérer dans de l'acide chlorhydrique dilué, à la température de 37°, les bacilles débarrassés des graisses et de la cholestérine : « cette opération, dit-il, donne la nucléine, et l'alcaloïde reste en solution ».

Au moyen de l'alcool, Baudran aurait séparé également des anaéroxydases, mises en évidence par l'eau gaiacolée.

Cendres. —

Kresling indique comme pourcentage de cendres 2,55 par rapport à une masse renfermant encore 3 gr.,93 d'eau pour 100, — soit 2 gr.,65 de cendres pour 100 gr. de bacilles desséchés à 100—110°.

Tous les autres auteurs donnent un chiffre beaucoup plus élevé :

Hammerschlag qui a fait plusieurs dosages a obtenu comme chiffre moyen 2,55 pour 100 gr. de bacilles frais dont il ne précise pas l'humidité.

Ruppel évalue le pourcentage par rapport au poids de bacilles desséchés à 100—110°, ce qui est plus exact, et le chiffre obtenu oscille autour de 8.

Mais aucune analyse détaillée des cendres ne fut faite par ces auteurs qui signalèrent seulement leur richesse en phosphore.

Ce furent de Schweinitz et Dorset qui les premiers s'attachèrent à déterminer et à doser les constituants minéraux du bacille tuberculeux ; en ce faisant ils pensaient pouvoir fixer d'une façon plus judicieuse les éléments favorables à sa culture. Tout d'abord ils reconnurent que le pourcentage des cendres variait avec le milieu nutritif et les chiffres extrêmes qu'ils ont trouvés sont 2 et 4 gr. pour 100 gr. de bacilles frais. Voici les éléments et leurs proportions qu'ils indiquent pour une analyse pratiquée sur des cendres de bacilles développés sur bouillon de bœuf peptoné glycériné, additionné de chlorure de sodium (0 gr.,5 p. 100) :

P^2O^5	55,23 p. 100
K^2O	6,35 —
Na^2O	13,62 —
CaO	12,64 —
MgO	11,55 —
C et SiO^2 . . .	0,57 —

En outre des composants donnés par de Schweinitz et Dorset, Baudran trouva du fer à raison de 0 gr.,006 à 0 gr.,008 pour 100 gr. de bacilles, et des traces de manganèse.

Kraus et Siebert, quelques années plus tard, donnèrent l'analyse suivante des cendres d'une part d'un bouillon peptoné et d'autre part des bacilles cultivés sur ce bouillon :

	Bouillon peptoné	Bacilles
	Cendres totales : 28,26 p. 100 du résidu sec	Cendres totales : 7,52 p. 100 des bacilles desséchés à 100°
PO^4H^3	8,57	51,25
Cl	43,98	6,6
SO^4H^2	2,25	0,84
SiO^2	0,26	0,19
Na	29,69	9,18
K	14,69	26,55
Mg	0,41	3,22
Ca	0,15	2,17

D'intéressantes contributions à la chimie du bacille tuberculeux ont été apportées par les recherches récentes d'Agulhon et Frouin (1919), puis de Goris (1920).

Agulhon et Frouin ont limité leur étude aux matières grasses. L'épuisement de la masse bacillaire, au préalable séchée, puis pulvérisée, fut fait dans un appareil de Kumagava et Suto, c'est-à-dire à une température voisine du point d'ébullition du solvant. De tous les solvants organiques qu'ils employèrent (alcool, acétone, benzine, chloroforme, éther), l'alcool absolu se montra le meilleur. En combinant l'hydrolyse totale des bacilles selon la méthode de Kumagava et Suto et la saponification de l'extrait alcoolique, Agulhon et Frouin ont calculé que la teneur du bacille tuberculeux en matières grasses totales ou plus exactement en substances susceptibles d'être extraites par les solvants des graisses pouvait être voisine de 42 gr. p. 100 de microbes secs, (ils expérimentèrent avec des bacilles provenant de cultures faites à l'Institut Pasteur sur bouillon glycériné en vue de la préparation de la tuberculine). Leur calcul toutefois est sujet à critique : la saponification directe des bacilles leur a donné 36 gr.,58 de matières grasses

totales p. 100 gr. de microbes secs, et l'extraction alcoolique leur en a donné 34 gr.,3. D'autre part, en saponifiant cet extrait ils n'obtinrent que 14 gr.,24 d'acides gras et 14 gr.,20 d'insaponifiable soluble dans l'éther de pétrole, soit au total 28 gr.,44, — et ils considèrent la différence, soit 5 gr.,86, comme représentant l'insaponifiable soluble dans l'eau : ce sont ces 5 gr.,86 qu'ils ajoutent aux 36 gr.,58 de l'hydrolyse directe pour obtenir la valeur de 42 gr. comme quantité de substances susceptibles d'être extraites par les solvants des graisses. Or les 5 gr.,86 de différence ne représentent pas seulement l'insaponifiable soluble dans l'eau mais aussi des sels et des produits de désintégration des matières protéiques.

L'extrait alcoolique est coloré au brun-rouge foncé et laisse avec le temps exsuder une huile brune ; il fond à 43–44° et renferme 0,638 d'azote et 0,2108 de phosphore p. 100 ; il est entièrement soluble à froid dans l'éther et le chloroforme.

Agulhon et Frouin l'ont fractionné par dissolution dans le chloroforme et précipitation de la solution chloroformique chaude par l'acétone bouillant. Dans ces conditions ils ont obtenu :

une portion 1 insoluble dans l'acétone bouillant (24 p. 100 de l'extrait alcoolique total) ;

une portion 2 soluble dans l'acétone bouillant (11 p. 100 de l'extrait alcoolique total), mais insoluble dans l'acétone froid ;

une portion 3 soluble dans l'acétone froid (65 p. 100 de l'extrait alcoolique total).

La portion 1 renferme la totalité du phosphore de l'extrait alcoolique et 46 p. 100 de son azote. C'est donc elle qui contient le phosphatide. Agulhon et Frouin se sont spécialement attachés à l'étude de ce corps. Ils l'ont purifié par dissolutions successives dans le chloroforme après précipitation par l'acétone et ont obtenu ainsi une substance représentant 14,55 p. 100 de l'extrait alcoolique primitif, brune, hygroscopique, soluble dans le chloroforme et l'éther, donnant avec l'eau une pseudo-solution visqueuse à reflets mordorés. Elle renferme 1,418 de phosphore et 1,298 d'azote p. 100 ; le rapport du phosphore à l'azote concorderait avec l'hypothèse d'un diaminomonophosphatide (Tamura). Toutefois il n'apparait pas à Agulhon et Frouin que ce phosphatide soit véritablement un corps de formule chimique

défini ; en effet sa saponification par la potasse alcoolique ne leur a pas donné seulement des acides gras (37 p. 100), une base analogue à la choline (dont ils n'ont pas obtenu le chloroplatinate à l'état cristalisé, mais seulement à l'état amorphe) et de la glycérine, mais encore une gomme qui par hydrolyse fournit du glucose. Or la présence de cette gomme semble bien, disent les auteurs, apporter la confirmation qu'il s'agit d'un complexe du genre des jécorines, malgré l'absence de soufre.

La portion 2, légèrement colorée, est de consistance dure à la température ordinaire. Par saponification elle donne 32,4 p. 100 d'acides gras et 60 p. 100 environ d'insaponifiable insoluble correspondant à la substance qu'étudia Tamura et qu'il considéra comme formé par les éthers d'un alcool supérieur, le mykol. Agulhon et Frouin ont purifié cet alcool en formant son éther acétique par ébullition dans l'anhydride acétique selon l'indication de Tamura : une portion demeure insoluble que les auteurs considèrent comme un mélange de carbures ayant sans doute échappé au savant japonais ; quant à l'éther du mykol il cristallise par refroidissement.

La portion 3 qui renferme de l'azote est constituée par un mélange de graisses neutres et d'autres gras libres ; abandonnée à elle-même elle laisse exsuder une huile brune non azotée.

Agulhon et Frouin n'ont pu caractériser la cholestérine dans les différentes portions.

Les recherches de Goris se sont étendues à tous les constituants du bacille, avec des investigations plus détaillées toutefois sur les matières grasses. Elles ont porté, comme celles d'Agulhon et Frouin, sur un mélange de bacilles humains et bovins développés sur bouillon de viande peptoné glycériné, et utilisés à l'Institut Pasteur pour la préparation de la tuberculine.

De la masse bacillaire stérilisée à 110°, puis lavée, séchée à l'étuve à 37° et enfin pulvérisée, Goris a séparé en trois opérations trois groupes de substances :

A — des substances solubles dans le chloroforme,

B — des substances solubles dans l'eau et précipitant par l'alcool,

C — des substances solubles dans l'eau et non précipitables par l'alcool.

A — Pour l'épuisement chloroformique, la masse bacillaire est additionnée d'une grande quantité de solvant et portée à l'ébullition qui est maintenue 1 ou 2 heures. Cette opération est renouvelée six ou huit fois de façon à obtenir un chloroforme incolore et une masse bacillaire complètement blanche. (Goris a expérimenté sur une quantité considérable de matière : 1345 gr. de bacilles désséchés, qui ont nécessité 34 à 35 litres de chloroforme pour leur épuisement complet). La quantité de substances dissoutes ainsi par le chloroforme a été en moyenne de 38,15 p. 100 du poids des bacilles secs. Goris donne de cette graisse brute les constantes suivantes :

Point de fusion	42°
Indice de saponification . .	124,4
Indice d'acidité	37,0
Indice d'éthérification . .	87,4
Indice d'iode	16,22
Indice de Hehner	69,77

Kresling s'était également servi de chloroforme comme liquide extracteur. Il avait obtenu, pour 100 gr. de bacilles desséchés, 38 gr.95 de substances fondant à 46° et des constantes qui sont sensiblement celles trouvées par Goris, sauf pour les indices de saponification et par suite d'éthérification qui sont plus faibles.

Par des fractionnements successifs Goris a isolé de la solution chloroformique :

1° un éther solide de nature particulière, soluble dans le chloroforme, insoluble dans l'éther éthylique, et qui se dédouble en donnant de l'acide crotonique mêlé d'un peu d'acide isocrotonique puis une essence à odeur de mimosa. Il l'appelle « *hyalinol* » pour rappeler sa propriété physique d'avoir la transparence du verre. Sa composition serait : C 55,5 ; H 7,15 ; O, par différence, 37, 35.

2° un mélange cireux contenant un phosphatide dont l'auteur ne précise pas la nature et qui, d'après le poids de phosphore dosé, correspondrait à environ 5 gr. de lécithine pour 100 de matières grasses totales. Par saponification ce mélange cireux libère d'une part deux alcools à poids moléculaire élevé,

dont le « mykol » de Tamura fondant à 65°, et un autre alcool fondant à 100° mais que Goris n'a pu étudier à cause de sa faible quantité ; d'autre part un mélange d'acides palmitique et stéarique.

Indépendamment de ce mélange cireux, Goris a isolé une cire qui serait un laurate de mykol.

3° une matière grasse constituée par des glycérides des acides oléique, palmitique, stéarique, arachidique ; des acides caproïque et butyrique existeraient aussi en faible quantité. Mais Goris n'a pu caractériser les acides isocétique et myristique signalés par Bulloch et Mac Leod.

Après épuisement par le chloroforme, les bacilles furent traités par l'alcool bouillant en vue d'y rechercher la matière sucrée, mais cette recherche fut négative. — Négative aussi fut la recherche des oxydases, des anaéroxydases, des ferments des hydrates de carbone et des glucosides.

B — La substance soluble dans l'eau et précipitée par l'alcool serait une nucléoalbumine donnant des réactions analogues à la tuberculine, quoique moins accentuées ; 100 gr. de bacilles secs en renfermeraient 1 gr.,20.

C — Les substances solubles dans l'eau et non précipitées par l'alcool seraient surtout constituées par des produits de transformation des matières albuminoïdes, c'est-à-dire des acides aminés, mais l'auteur n'en a pas fait l'étude systématique ; 100 gr. de bacilles secs en renfermeraient 4 gr. 15.

Goris n'a pu isoler de cholestérine à l'état libre ; toutefois une solution chloroformique des substances lipoïdes du bacille lui a donné avec l'acide sulfurique concentré, au bout d'un temps assez long, une réaction colorée analogue à celle de la cholestérine (réaction de Salkowski).

Il n'a pu obtenir de coloration violette en traitant par le chlorure de zinc ou par l'acide sulfurique et l'iode les bacilles épuisés par le chloroforme et l'eau.

Dans les cendres, évaluées à 2 gr.,5 pour 100 gr. de masse bacillaire (le degré d'humidité de cette masse n'est pas spécifié) l'auteur a caractérisé et dosé les éléments suivants :

P^2O^5	. . .	43,4 p. 100 de cendres
SO^4H^2	. . .	22,8 —
Na	. . . .	11,6 —

K	7,7	p. 100 de cendres
Ca	9,7	—
Mg	5,7	—

puis des traces indosables de Fe, Mn et Zn (la présence de ce dernier métal pouvant être accidentelle),

c'est-à-dire sensiblement ce que les analyses de de Schweinitz et Dorset et de Baudran avaient fait connaître, mais en outre des sulfates qui avaient échappé aux précédents auteurs.

A cet exposé des recherches faites sur la constitution chimique du bacille tuberculeux se rattachent l'étude et la classification des divers constituants au point de vue de leur action physiologique et pathogénique, c'est-à-dire envisagés comme toxines. Ils formeraient les endotoxines par opposition aux exotoxines qui sont les produits toxiques excrétés par le bacille au cours de son développement.

Dans cet ordre d'idées, Behring distingua chez le bacille tuberculeux les trois groupes suivants de substances :

1) – une substance soluble seulement dans l'eau pure et « possédant une action fermentative et catalytique ». Elle aurait toutes les qualités chromophiles, physiques et chimiques de la volutine décrite par Arthur Meyer, botaniste de Marbourg[1]), et Behring la nomma T. V. (De cette substance soluble dans l'eau dériveraient, d'après Behring, toutes les parties toxiques de la tuberculine de Koch, et 1 milligr. de T. V. à l'état sec serait plus puissant que 1 litre de tuberculine).

2) – une substance globulineuse, soluble seulement dans une solution de sel neutre (p. ex. une solution de NaCl à 10%) et nommée T. G. L. (Elle est toxique à la façon de la tuberculine de Koch).

3) – plusieurs substances non toxiques solubles seulement dans l'alcool, l'éther, le chloroforme.

[1]) A. Meyer désigna sous le nom de Grains de volutine (Volutin Körper) les corpuscules métachromatiques parce que ces corps sont particulièrement abondants dans le *Spirillum volutans*. D'après lui, la « volutine » qui les constitue serait une combinaison acide ou saturée d'ac. nucléique avec une base quelconque (probablement organique) qui ne donne pas les réactions microchimiques des albuminoïdes. Il a effectué sur l'ac. nucléique la série des réactions de la volutine et a constaté que la plupart de ces réactions concordaient pour ces deux corps. Certaines différences ne permettent pas toutefois de les assimiler.

C'est de même l'extraction et la classification des toxines ainsi que l'étude de leurs propriétés pathogéniques qu'Auclair et Paris eurent surtout comme but dans les recherches qu'ils poursuivirent sur la constitution du bacille tuberculeux.

Voici d'abord leur façon d'envisager les toxines microbiennes : ce sont non pas des corps quelconques élaborés par les microorganismes et jouissant de propriétés plus ou moins toxiques, mais des substances qui possèdent le pouvoir de reproduire les effets ou une partie des effets constatés au cours de la maladie infectieuse considérée.

La première toxine répondant à cette définition est la toxine diphtérique isolée et décrite par Roux et Yersin en 1888. Cette toxine, qui présente les propriétés chimiques des albumoses, est également la première substance protéique toxique connue. — Deux ans plus tard Knud Faber, poursuivant des recherches dans cette voie, reproduisit le tétanos expérimental avec des produits solubles du bacille de Nicolaïer.

Longtemps on attribua tous les désordres causés dans l'organisme par les microbes à des toxines sécrétées par ceux-ci et solubles dans le bouillon de culture : cette conception est exacte pour le bacille de la diphtérie et celui du tétanos, et semblablement Koch chercha la toxine tuberculeuse dans les produits solubles du bacille et présenta comme telle sa tuberculine. — Or avec cette substance il est impossible de reproduire les lésions de la tuberculose. Il convient donc de chercher dans le bacille lui-même les toxines spécifiques : dès 1897 Auclair signalait et expérimentait les toxines adipo-cireuses, puis plus tard les toxines protoplasmiques.

D'une manière générale, Auclair et Paris divisent toutes les toxines microbiennes en 3 classes d'après leurs caractères chimiques :

1re *classe*. — Toxines albuminoïdes solubles qui, grâce à leur diffusion rapide, ont une action immédiate et générale. Elles sont obtenues par macération de la masse bacillaire dans l'eau distillée à 38° et dans une solution de chlorure de sodium à 10 °/oo à la même température.

2me *classe*. — Toxines adipo-cireuses ou toxines lipoïdes qui par suite de leur insolubilité dans le milieu intérieur, n'exer-

cent leur action qu'à l'endroit même où elles ont été déposées. Elles sont extraites par épuisements successifs des microbes dans un appareil Soxhlet au moyen de l'alcool absolu, puis de l'éther, puis du chloroforme.

3me *classe.* — Toxines albuminoïdes insolubles ou toxines protoplasmiques qui constituent la substance protoplasmique du microbe, c'est-à-dire qui sont le siège des phénomènes d'assimilation et de désassimilation pendant la vie de la cellule bactérienne et qui après sa mort jouissent de propriétés toxiques de deux ordres : d'une part elles provoquent une intoxication locale (analogie avec les poisons adipo-cireux) ; d'autre part une intoxication générale grâce à une solubilisation secondaire de la toxine (analogie avec les poisons solubles). On les isole en traitant par l'acide acétique cristallisable, à 80°, la masse microbienne privée des matières grasses, et en les précipitant par la soude de leur solution acétique.

Le terme d'exotoxines réservé par certains auteurs aux seuls poisons diffusibles dans les milieux de culture peut être étendu aux toxines solubles dans l'eau ou l'eau salée — (encore que celles-ci soient peut-être bien dues partiellement à des phénomènes d'autolyse) —, et les véritables endotoxines seraient constituées par les poisons lipoïdes et protoplasmiques, c'est-à-dire par les poisons insolubles dans l'eau et l'eau chlorurée sodique.[1])

Cette série d'opérations appliquée au bacilles tuberculeux fournit à Auclair et Paris les substances suivantes :

1°) comme toxines solubles : [2]) { des albumoses, une petite quantité d'albumines et de globulines.

2°) comme toxine protoplasmique { une paranucléo-albumine (appelée bacillo-caséine).

---

[1]) Toutefois Besredka a fait remarquer, à juste titre semble-t-il, qu'il s'agit dans ce cas moins d'endotoxines que d'extraits alcoolique éthéré, chloroformique ou autres qui sont des dérivés plus ou moins artificiels du protoplasma microbien, nullement comparables aux vraies endotoxines.

[2]) Ce serait une partie de la tuberculine de Koch, et ce serait la T. V. et la T. G. L. de Behring.

3°) comme toxines lipoïdes :
- des acides gras (non caractérisés),
- des graisses neutres (non cacartérisées),
- de la lécithine,
- de la cholestérine ou substance analogue,
- des substances cireuses indéterminées.

Ces corps ou plus exactement ces groupes de corps ont physiologiquement des actions différentes et leur ensemble aurait permis à Auclair et Paris de reproduire les principales et les plus caractérisées d'entre les lésions tuberculeuses.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Bien que la constitution chimique du bacille tuberculeux soit loin d'être définitivement établie, mon but ne fut pas de rechercher sur la nature des composants de ce microbe ce que les nombreux travaux jusqu'ici parus laissent encore à glaner et à préciser, mais d'étudier les variations intéressantes que ces composants peuvent subir dans certaines conditions biologiques, par exemple au cours du développement microbien, ou bien et surtout lorsque varie la constitution du milieu nutritif. Là aussi d'ailleurs le champ d'investigation demeure vaste.

J'indiquerai chaque fois les techniques de dosages que j'ai employées, et les remarques faites au cours de ces dosages, si limités qu'ils fûssent. — Au surplus, opérant avec les cultures que je produisais et qu'il m'était matériellement impossible de beaucoup multiplier, je ne disposais pas des énormes quantités de substances qui seules permettent de pousser fructueusement les recherches sans laisser échapper certains corps.

Pour éviter toute perte ou modification dues à la stérilisation, mes recherches furent d'une façon générale faites sur des cultures vivantes.

1.

VARIATIONS DES PROPORTIONS D'EAU ET D'AZOTE DANS LE BACILLE TUBERCULEUX AU COURS DE SON DÉVELOPPEMENT.

Technique des dosages.

Eau. — J'ai indiqué (page 19) la technique courante suivie pour la détermination du poids sec. Dans ces conditions on trouve que 100 gr. de bacilles frais donnent généralement de 13 à 18 gr. de bacilles secs, soit 82 à 87 gr. d'eau.

Mais si l'on se propose le dosage de l'humidité même, les résultats que donne ce mode opératoire ne sont pas très rigoureux ; ils expriment en réalité l'humidité apparente, pêchant par excès, puisqu'ils représentent non seulement l'eau que renferme la cellule bactérienne mais encore celle adhérente aux bacilles et provenant des lavages. Pour me rapprocher du taux d'humidité vraie, propre aux bacilles, voici comment j'ai opéré :

Le contenu des ballons de culture est versé dans un entonnoir dont la douille est garnie de coton un peu serré. Pour enlever toute trace du liquide nutritif, les bacilles ainsi recueillis sont lavés à l'eau distillée (en s'aidant de la trompe, car la filtration est parfois très lente), puis placés sur un disque de papier dur, reposant lui-même sur plusieurs épaisseurs de papier à filtrer ordinaire. A l'aide d'une petite stapule très flexible la masse bacillaire est mélangée et étalée à plusieurs reprises, *sans pression*, sur le disque de papier-filtre de manière à la rendre homogène, les épaisseurs de papier à filtrer ordinaire sous-jacentes étant renouvelées jusqu'à ce qu'elles demeurent sèches : c'est ce critérium d'essorage que j'ai adopté dans mes dosages pour considérer les bacilles comme débarrassés de l'eau étrangère qu'ils retenaient ; il n'est évidemment pas absolu mais du moins permet des dosages comparables.

De cette masse homogène et essorée une partie, du volume d'un pois environ (représentant 500 à 600 mgr. de bacilles frais), étendue en couche mince sur le fond d'une capsule ou sur un verre de montre tarés, est pesée puis laissée 1 heure dans l'étuve à 105° et pesée à nouveau (de nombreux essais m'ont montré qu'au bout de ce laps de temps il n'y avait plus perte de poids). Le calcul donne le pourcentage de l'humidité.

Dessication dans le vide. — Ayant, comparativement avec la dessication faite à l'étuve, placé sous la cloche à vide en présence de l'acide sulfurique un semblable échantillon de la masse bacillaire prélevé de la même façon sur le même milieu, jamais je n'ai pu atteindre la dessication que donne l'étuve, si prolongée que fût l'action du vide. Lorsque le poids demeurait constant, le rapport moyen entre la dessication obtenue dans l'étuve et celle obtenue dans le vide était $\frac{19,5}{23}$, c'est-à-dire que 100 gr. de bacilles frais deviennent 19 gr., 5 de bacilles secs dans l'étuve et 23 gr. dans le vide.

Azote total. — Le dosage de l'azote total a été fait par voie humide selon la méthode de KJELDAHL et avec l'appareil d'AUBIN.

Les composés azotés du bacille furent détruits au moyen de l'acide sulfurique et de l'oxalate de potassium comme agent réducteur selon la technique de DENIGÈS. L'attaque était prolongée, après décoloration, un temps égal à celui qui s'était écoulé depuis le début de l'expérience. Dans ces conditions la totalité de l'azote est hydrogénée à l'état d'ammoniaque.

Le poids de la prise d'essai a varié de 400 à 600 mgr. de bacilles frais. L'opération durait en moyenne 4 heures.

Le titrage de l'ammoniaque fut effectué avec une solution d'acide sulfurique déci-normale, l'hélianthine servant d'indicateur.

Les bacilles [1]) se sont développés sur le milieu chimiquement défini indiqué page 24. Comme dans toutes mes expériences, le liquide nutritif était réparti dans des ballons de 250 cm^3 à raison de 50 cm^3 par ballon, et ensemencé dans les conditions antérieurement décrites.

Les premiers dosages ont été faits 10 jours après l'ensemencement, la race de bacilles sur laquelle j'expérimentais ne donnant pas plus tôt un voile suffisant. Les dosages ultérieurs eurent lieu à des intervalles irréguliers déterminés par l'état de la culture. Le Tableau XIV contient les résultats obtenus, résultats qui chaque fois représentent la moyenne des cultures de 5 ballons (les dosages ont toujours été faits en double ; la concordance dans les essais fut généralement parfaite : les différences observées n'ont pas dépassé 0,20 pour 100).

La culture s'est développée jusqu'au 25e jour, puis, après un état à peu près stationnaire de 5 à 6 jours, le voile microbien s'immerge partiellement : il y a autolyse et le poids de la récolte diminue. Comme cela avait été établi pour le *Sterigmatocystis*, la récolte passe donc, dans un temps donné, par un maximum.

Le graphique II donne les proportions centésimales d'eau et d'azote total en fonction du poids de la récolte : en abscisses sont les poids secs de la culture avec les âges correspondants, en ordonnées les valeurs correspondantes d'eau et d'azote.

---

[1]) Race de bacilles tuberculeux humains provenant du Laboratoire de M. le Professeur BORREL.

GRAPHIQUE II.

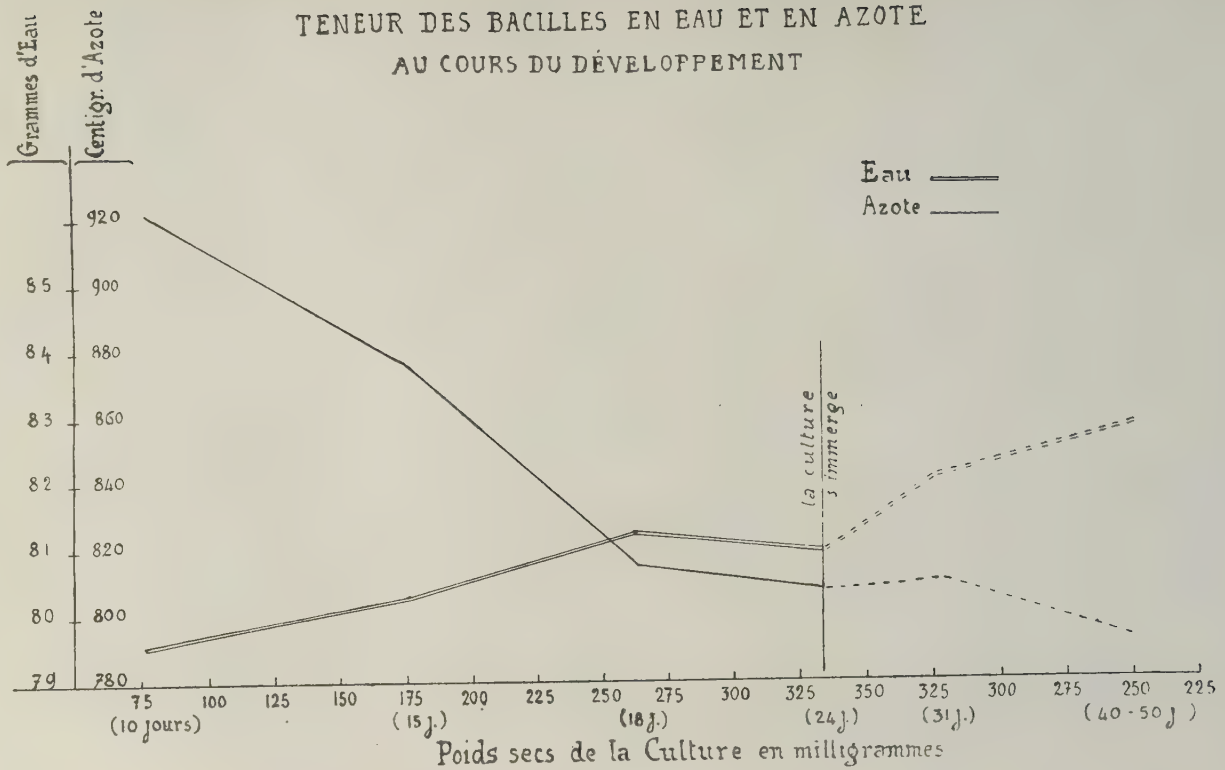


TABLEAU XIV.

Variations des proportions d'eau et d'azote dans le bacille au cours de son développement.

(Résultats exprimés en grammes)

Age de la culture (en jours)	Récolte moyenne par ballon de 50 cm³		Teneur en eau de 100 grammes de bacilles frais	Teneur en azote de 100 grammes	
	en bacilles frais	en bacilles secs		de bacilles frais	de bacilles secs
10	0,370	0,076	79,50	1,90	9,22
15	0,903	0,178	80,30	1,72	8,76
18	1,413	0,265	81,25	1,529	8,15
24	1,736	0,330	81	1,534	8,07
31 (commence à s'immerger)	1,807	0,323	82,13	1,449	8,10
49 (immergée)	1,394	0,244	82,50	1,376	7,86
50 (immergée)	1,575	0,256	83,75	1,284	7.90

Sans doute les voiles recueillis pour les dosages comportent nécessairement un mélange de bacilles jeunes et de bacilles âgés, et l'accroissement ou l'épaississement des voiles ne sont pas toujours très réguliers (du moins en fut-il ainsi avec la race de bacilles en expérience). Ces faits resserrent les limites extrêmes et réduisent les différences, néanmoins la moyenne obtenue a ses dominantes et les deux courbes donnent des indications nettes : d'une part il y a avec l'âge, *au cours du développement*, augmentation de la teneur en eau, d'autre part diminution de la teneur en azote. La teneur en eau passe par un maximum, la teneur en azote par un minimum, tous deux suivis d'un temps en plateau coïncidant avec la période où la culture a

atteint son plein développement et *ne s'accroît plus*. — Puis, en vieillissant, la culture s'immerge, les bacilles s'hydratent tandis qu'il y a autolyse et perte d'azote.

La décroissance de la proportion centésimale d'azote avec le développement avait été signalée dans les plantes vertes. Ainsi G. André rapporte à ce point de vue une analyse faite sur le blé (plante totale) et d'aprés laquelle le taux d'azote qui était en mai de 4 gr.,60 pour 100 gr. de matière sèche n'est plus que de 1 gr.,40 en juillet. — Récemment Terroine, Wurmser et Montané ont remarqué une semblable décroissance au cours du développement du *Sterigmatocystis* : alors que le taux d'azote est de 6,6 dans des récoltes inférieures à 0 gr.,100, il n'est que de 5,3 quand le poids de la récolte atteint 1 gr. à 1 gr., 50.

Qu'il s'agisse de plantes à chlorophylle, de moisissures ou de bactéries, le phénomène parait donc général.

2.

VARIATIONS DE LA TENEUR DU BACILLE TUBERCULEUX EN AZOTE AVEC LA NATURE ET LA CONCENTRATION DE L'ALIMENT AZOTÉ.

Si la nature ou la quantité de l'azote alimentaire varient, le milieu par ailleurs demeurant le même (la glycérine dans tous les cas est l'aliment ternaire), ce changement peut-il déterminer aussi des variations dans la teneur en azote du bacille, ou bien celle-ci demeure-t-elle constante ?

Les sources d'azote furent l'asparagine, l'acide aspartique, l'urée, puis la peptone jointe aux substances azotées indéterminées que renferme le bouillon de viande. L'asparagine fut employée aux concentrations de 2 gr.,25 et 10 gr. par litre.

Le Tableau XV réunit les données de l'expérience et les résultats obtenus. — La technique de dosage a été la même que précédemment.

TABLEAU XV.

Variations de la teneur du bacille en azote avec la nature et la concentration de l'aliment azoté.

Aliment ternaire: glycérine, 40 grammes par litre.

(Les résultats sont exprimés en grammes.)

Aliment azoté			Récolte après 28 jours de culture		
Nature de l'aliment	Quantité dissoute dans 1 litre de liq. nutritif	Teneur en Azote de 1 litre de liq. nutritif	Poids sec par litre de liq. nutritif	Teneur en Azote de la récolte par litre	Teneur en Azote de 100 gr. de bacilles secs
			(moyenne de plusieurs dosages)		
Bouillon de viande additonné de 10 gr. de Peptone Chapoteaut par litre	»	2,20	6,48	0,413	6,38*
Urée	4	1,86	5,60	0,442	7,90
Asparagine	10	1,86	8,64	0,725	8,40
– id. –	2,25	0,42	6,20	0,378	6,10
Ac. aspartique	4	0,42	8,62	0,344	4

* Avec des cultures de bacilles tuberculeux faites sur «Bouillon glycériné ordinaire» (sans autre indication), ALILAIRE et FERNBACH ont trouvé un taux d'azote de 4 gr., 88 pour 100 gr. de bacilles secs.

Les poids des récoltes, malgré leurs différences, témoignent que les bacilles avaient dans tous les cas une alimentation convenable permettant leur développement, et même dans les milieux les plus pauvres en azote celui-ci ne fut pas utilisé en totalité.

On voit que, pour un égal apport d'azote, l'urée substituée à l'asparagine ne modifie pas grandement la teneur des bacilles en azote. Par contre l'acide aspartique substitué à l'asparagine provoque un abaissement sensible de cette teneur. Le bouillon peptoné, malgré un apport plus élevé d'azote, fournit des bacilles moins riches en matières protéiques que ceux développés sur le milieu renfermant 10 gr. d'asparagine.

Quant à l'influence de la concentration, elle est sensible : la teneur en azote de 100 gr. de bacilles secs se trouve abaissée de 2 gr.,2 quand, dans le milieu, la quantité d'asparagine est diminuée dans la proportion de 4,5 à 1.

Avec le *Sterigmatocystis*, Terroine, Wurmser, et Montané ont noté une influence parfois très nette de la nature de l'aliment azoté : si la substitution de l'urée ou du nitrate de sodium au sulfate d'ammonium modifie à peine la teneur en azote des récoltes (5,57 et 5,2 au lieu de 6) celle de la peptone et surtout de la guanidine l'abaisse fortement (4,9 et 3,3). — Mais la variation de la concentration en sulfate d'ammonium dans des limites très étendues (de 10 à 100 gr. par litre) n'a en rien influencé la teneur de la moisissure en azote.

La plasticité plus grande que montre à cet égard le bacille tuberculeux est partagée par d'autres bactéries, et peut-être l'est-elle par toutes. En tout cas Cramer avait déjà reconnu semblable variation avec 4 espèces bactériennes (le bacille capsulé de Pfeiffer, le bacille de Friedlander, et deux autres bacilles voisins des précédents) : cultivées sur deux milieux dont l'un renfermait 10 gr. de peptone par litre et l'autre 50 gr., toutes choses égales d'ailleurs, elles présentaient dans le second cas un accroissement de leur teneur centésimale en azote de 1 gr. à 1 gr.,50 (Il n'y avait pas, dans le milieu à 10 gr. de peptone par litre, déficience en aliment azoté car il renfermait encore plus d'azote que n'en utilisait la culture).

La physiologie des Bactéries semble donc différer en cela de celle du *Sterigmtocystis* et des animaux supérieurs.

3.

VARIATIONS DE LA TENEUR DU BACILLE TUBERCULEUX EN MATIÈRES GRASSES ET EN MATIÈRES ALBUMINOÏDES AVEC LA NATURE DE L'ALIMENT TERNAIRE.

Aronson avait signalé les variations assez étendues de la teneur en matières grasses des bacilles tuberculeux avec l'âge des cultures, les bacilles jeunes étant naturellement moins riches en graisses. De Schweinitz et Dorset reconnurent que le taux des matières cédées à l'éther ou à l'alcool variait avec l'origine

humaine, bovine, chevaline, ou porcine des bacilles. Mais aucune recherche ne fut faite sur l'influence que pouvait avoir l'alimentation sur la quantité et la qualité des corps gras. Au reste, la nature du milieu intervient peu dans les différences que présentent les résultats d'analyses des divers auteurs car les bacilles sur lesquels ils ont expérimenté provenaient en général de culture sur bouillon de viande glycériné. Toutefois de Schweinitz et Dorset ont analysé aussi des bacilles développés sur milieu minéral défini, avec asparagine et glycérine, et constatèrent qu'ils renfermaient un peu moins de matières grasses. En tout cas les différents milieux nutritifs, quels qu'ils fussent, contenaient tous le même aliment ternaire : la glycérine.

Ayant obtenu des récoltes également belles sur deux milieux simples et chimiquement définis mais différant essentiellement par l'aliment ternaire, glycérine dans un cas, glucose dans l'autre, j'ai cherché si des modifications étaient apportées à la composition du bacille par un changement aussi important de son milieu de culture.

J'ai fait deux séries d'expériences portant toutes deux sur les matières grasses [1]) et sur les matières albuminoïdes. A cause de la nature des recherches poursuivies, la technique employée pour l'extraction des matières grasses ne fut pas la même dans l'une et l'autre série.

On sait que dans tout tissu organique les graisses sont retenues, au moins pour une part, de si forte façon qu'un épuisement dans l'appareil de Soxhlet par l'un de leurs solvants habituels ne suffit pas à les en retirer en totalité, quelque prolongé que soit cet épuisement. Ainsi depuis des recherches de Pfluger il est connu que l'éther n'extrait pas tout ce qui est soluble dans l'éther, et H. Iscovesco, à propos du dosage des lipoïdes dans les organes, a montré entre autres expériences que la grande thyroïde épuisée par l'éther donne, lorsqu'on l'épuise successivement par l'acétone, le chloroforme et l'alcool, presque autant de lipoïdes que l'extraction éthérée initiale bien

[1]) Je donne au terme « matières grasses » son sens le plus vaste, englobant à la fois les graisses proprement dites, les acides gras, puis les corps qu'Overton a désignés sous le nom de lipoïdes, à savoir les stérines et leurs éthers, les phosphatides, etc..., corps de constitution chimique différente et qui trouvent leur unité dans des considérations histologiques ou biologiques plutôt que chimiques.

que ces divers lipoïdes soient en grande partie parfaitement solubles dans l'éther.

Il en est de même avec le bacille tuberculeux et l'action successive de divers solvants est nécessaire lorsqu'on emploie l'appareil de Soxhlet : après avoir épuisé la masse bacillaire par l'éther jusqu'à ce que rien ne se dissolve plus, si on l'épuise par le chloroforme celui-ci enlève encore des matières grasses solubles pourtant dans l'éther.

Pour donner aux solvants leur maximum d'action, deux conditions paraissent indispensables : les faire agir d'une part sur des cellules au préalable dissociées, broyées, c'est-à-dire que la masse bacillaire séchée doit être pulvérisée, — et d'autre part à la température la plus élevée possible, c'est-à-dire à leur température d'ébullition ainsi qu'opéra Schimidzu.

Kumagawa et Suto résolurent avec ingéniosité ce dernier point en modifiant l'appareil Soxhlet de façon que la substance à épuiser fût placée dans la vapeur même du solvant.

Sans doute on pourrait, comme procéda Goris, faire directement bouillir la masse bacillaire avec le liquide extracteur, mais alors il faut traiter la substance à plusieurs reprises avec de très grandes quantités de liquide, ce qui est dispendieux et peu pratique.

Les expériences de Kumagawa et Suto avaient été faites avec de la poudre de viande, et dans leur appareil ils essayèrent successivement comme solvants : l'alcool absolu[1]), le chloroforme, l'éther, l'éther de pétrole, l'acétone, l'éther acétique, l'alcool méthylique. La durée de l'épuisement était d'environ 5 heures. C'est l'alcool éthylique qui enleva le plus de substances solubles dans l'éther. Si on lui donne à ce point de vue la puissance extractive 100, voici les coefficients relatifs des autres solvants : alcool méthylique 99,— éther acétique 77,— chloroforme 72,— acétone 62,— benzène 53,— éther absolu 46,— éther de pétrole 45.

Avec le bacille tuberculeux, c'est également l'alcool qui extrait le maximum de substances solubles dans les solvants de graisses, puis viennent l'éther éthylique, l'acétone, le chloroforme, l'éther de pétrole. Leurs coefficients d'extraction seraient

[1]) Grimbert qui a fait des extractions comparatives avec l'alcool absolu et l'alcool à 95° obtint avec ce dernier les mêmes résultats.

approximativement d'après les recherches de Frouin : alcool 100, — éther éthylique 80, — acétone 74, — chloroforme 60, — éther de pétrole 20.

Je me suis rendu compte que si l'on opère sur des bacilles non préalablement pulvérisés, le taux des substances échappant à l'action dissolvante de l'alcool bouillant peut atteindre 20 et 25 pour 100.

Si après épuisement par l'alcool on fait agir le chloroforme ou l'éther, ces derniers solvants ne dissolvent plus que des traces minimes de substances. Au contraire si l'on reprend par l'alcool bouillant la masse bacillaire épuisée par le chloroforme, on enlève encore une appréciable quantité de substances solubles dans l'éther. La supériorité qu'a l'alcool comme dissolvant est due vraisemblablement à sa solubilité dans l'eau, à son point d'ébullition plus élevé et aussi à ce qu'il dissocie les combinaisons protéiques sous lesquelles les matières grasses se trouvent dans les tissus.

Kumagawa et Suto ont indiqué une autre méthode : al saponification directe par la soude caustique qui réalise une destruction complète de la structure cellulaire et leur a donné un taux d'acides gras un peu plus élevé que l'épuisement à l'alcool bouillant. Alors que celui-ci retire 7 gr.,128 d'acides gras pour 100 gr. de poudre de viande, la saponification directe en isole 7 gr.,156. Si d'ailleurs on saponifie le résidu de poudre de viande après épuisement à l'alcool on retrouve la différence.

A. — PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES.

Parfaites lorsqu'on se borne à la seule étude des matières grasses, ces méthodes (saponification directe ou épuisement à l'alcool bouillant) ne sont pas toujours applicables lorsqu'on doit effectuer d'autres recherches sur le même échantillon. Elles modifient ou détruisent en effet les matières albuminoïdes que l'on peut avoir ultérieurement à déterminer ; d'autre part la saponification directe ne permet pas le dosage séparé des acides gras libres.

Pour ces raisons dans une première série d'expériences j'ai opéré différemment.

Mes recherches ont porté sur des bacilles humains de 3 souches différentes développées d'une part sur le milieu à la glycérine, d'autre part sur le milieu au glucose. Les cultures étaient âgées de 1 mois.

I. — Matières grasses.

Technique.

a) **Extrait total.**— Les bacilles furent épuisés dans un appareil Soxhlet et les épuisements furent faits sous pression réduite de façon que la température à l'intérieur de l'appareil ne dépassât jamais 50°.

Comme solvants j'employai successivement l'alcool à 95° et l'éther. L'action dissolvante de ce dernier est facilitée par l'alcool qui libère les graisses et lipoïdes de leurs complexes avec les albuminoïdes : c'est du reste sur ce principe que sont basés la méthode d'Adam pour le dosage du beurre dans le lait et le procédé colorimétrique de Grigaut pour le dosage de la cholestérine dans le sérum et les tissus. Ayant reconnu que le chloroforme enlevait au bacille tuberculeux des substances qui ne se dissolvent pas dans l'éther (alors que la totalité de l'extrait éthéré est soluble dans le chloroforme), j'ai complété l'épuisement par le chloroforme.

Chaque dissolvant a agi environ 20 heures. D'ailleurs avant d'abandonner un solvant pour passer au suivant, je m'assurais qu'il ne dissolvait plus rien en arrêtant la distillation au moment où le liquide était prêt à siphonner, puis en prélevant une petite quantité de liquide et l'évaporant sur un verre de montre.

Si, dans ces conditions, la totalité des substances grasses ne fut pas extraite, du moins les résultats relatifs obtenus furent-ils comparables et par suite suffisants pour le but que je poursuivais.

Finalement, pour chacun des milieux (milieu à la glycérine et milieu au glucose), les extraits alcoolique, éthéré et chloroformique correspondant à une même souche de bacilles furent réunis en une masse rendue homogène par fusion.

b) **Acides gras libres** (Indice d'acidité). — Ils furent dosés acidimétriquement sur une prise d'essai (0 gr., 50 à 1 gr.) de l'extrait homogène dissoute dans 50 cm^3 d'alcool, en se servant d'une liqueur de soude N/10 et de phtaléine comme indicateur. (L'extrait étant passablement coloré, le virage est contrôlé par le procédé à la touche). L'indice d'acidité est donné par la formule $\frac{n}{p} \times 5{,}6$ (n étant le nombre de centi-cubes de soude N/10 écoulés et p le poids en grammes de la prise d'essai). — On peut l'exprimer en acide oléique sachant que 1 cm^3 de soude N/10 neutralise 0 gr.,0282 de cet acide.

Le dosage des acides gras libres fut effectué seulement

sur deux souches de bacilles, — les graisses extraites de la troisième souche ayant servi à des recherches qualitatives, en particulier à celles de la cholestérine.

Les Tableaux XVI et XVII résument les résultats obtenus.

On voit que les mêmes bacilles développés sur un milieu dans lequel la source de carbone est du glucose à la place de glycérine, la quantité de carbone et toutes les autres conditions étant d'ailleurs identiques, ont une teneur en matières grasses 2 à 3 fois moindre. — En outre la composition de cette matière grasse est différente de celle des matières grasses élaborées par les bacilles de même espèce développés sur milieu glycériné : elle est plus riche en acides gras libres ; ceux-ci atteignent en effet une proportion moyenne de 22 gr., 73 pour 100 gr. d'extrait au lieu de 17 gr., 55, soit une augmentation de 29%.

On voit également que, développées sur le même milieu (milieu à la glycérine ou milieu au glucose), les trois souches de bacilles, toutes d'origine humaine pourtant, présentent néanmoins entre elles des différences quant à leur teneur en corps gras (écart atteignant 4 gr. pour 100 gr. de bacilles secs).

La trop petite quantité de matière dont je disposais ne m'a pas permis le dosage du phosphore lipoïdique considéré comme élément de mesure pour évaluer l'ensemble des phosphatides.

D'autre part on ne peut guère songer à obtenir ,avec la masse brunâtre qu'est l'extrait brut, les principales réactions de la cholestérine : celles de Salkowski (avec le chloroforme et l'acide sulfurique), de Liebermann-Burchard (avec l'anhydrique acétique et l'acide sulfurique), de Schiff (avec l'acide chlorhydrique contenant un peu de chlorure ferrique.). — Mais on ne les obtient pas nettement non plus en éliminant par saponification la majeure partie des graisses auxquelles la cholestérine peut se trouver intimement mélangée. (Une petite quantité d'extrait est chauffée à l'ébullition dans un tube à essai avec deux pastilles de potasse et 4 à 5 cm^3 d'eau ; les graisses

TABLEAU XVI.

Matières grasses extraites des bacilles.

		Bacilles développés sur milieu glycériné			Bacilles développés sur milieu glucosé		
		Souche A	Souche B	Souche C	Souche A	Souche B	Souche C
Poids des bacilles soumis à l'épuisement	frais . . . . . :	15 gr. 27	16 gr. 30	15 gr.	18 gr. 40	20 gr. 60	20 gr. 20
	Humidité . . . . :	*84,7 %*	*84 %*	*85,4 %*	*82,3 %*	*82 %*	*83,3 %*
	sec . . . . . :	2,336	2,60	2,19	3,256	3,70	3,37
Poids de l'extrait	alcoolique . . . . :	0,206	0,170	0,192	0,131	0,162	0,140
	éthéré . . . . . :	0,560	0,640	0,480	0,260	0,391	0,316
	chloroformique . .	0,138	0,133	0,103	0,081	0,124	0,083
	total . . . . . :	0,904	0,943	0,775	0,472	0,677	0,539
Poids de l'extrait total pour 100 gr. de bacilles secs . . . . . :		38,7	36,6	35,4	14,5	18,3	16

TABLEAU XVII.

Acides gras libres contenus dans l'extrait alcoolo-éthéro-chloroformique.

	Bacilles développés sur milieu glycériné		Bacilles développés sur milieu glucosé	
	A	B	A	B
Prise d'essai	0 gr. 810	0 gr. 786	0 gr. 402	0 gr. 522
SO^4H^2 $N/_{10}$ nécessaire pour la saturation	4 c. c. 95	5 c. c.	3 c. c. 30	4 c. c. 15
Acides gras libres, en acide oléique — dans la prise d'essai:	0 gr. 139	0 gr. 141	0 gr. 092	0 gr. 117
Acides gras libres, en acide oléique — dans 100 gr. d'extrait:	17,16	17,93	23,05	22,40
Indice d'acidité	34	35,6	46	44,5

sont transformées ainsi en savons qui se dissolvent dans l'eau ; on filtre et fait les réactions avec le résidu insoluble qui doit renfermer la cholestérine). Ce résidu est en effet fortement coloré et, partant, les réactions sont douteuses. Elles furent essayées ultérieurement dans des conditions meilleures. (Deuxième série d'expériences).

II. — Matières protéiques.

Technique.

L'extraction des matières protéiques a été faite en 3 temps :

1° — Les cultures filtrées et lavées, sont mises à macérer 48 heures à l'étuve à 37—38° dans dix fois environ leur poids d'eau salée (renfermant 9 gr. de chlorure de sodium par litre) stérile et additionnée de chloroforme et de toluène.

Les matières protéiques diffusées sont précipitées en acidifiant par l'acide acétique et saturant de sulfate d'ammonium le liquide séparé des bacilles par filtration suivie de centrifugation : le précipité obtenu, dépouillé du sel en excès par dialyse, est désséché dans le vide sulfurique et pesé. Il est redissous dans l'eau salée pour servir aux réactions.

2° — Les bacilles sont ensuite épuisés par l'eau dans l'appareil de Soxhlet pendant 30 heures à une température ne dépassant pas 50° grâce au vide fait dans l'appareil. Les matières protéiques dissoutes sont dosées par évaporation d'une partie aliquote du liquide.

(C'est à la suite de cette opération que les bacilles sont épuisés par l'alcool, l'éther et le chloroforme pour en extraire les corps gras).

3° — Enfin la masse bacillaire retirée après épuisement par l'alcool, l'éther et le chloroforme, est mise à digérer à l'étuve à 50—60° pendant 12 heures dans une solution de soude à 5%. Au liquide filtré, de couleur jaune, on ajoute de l'acide acétique jusqu'à réaction acide : le précipité obtenu, recueilli sur un filtre, est séché et pesé ; le filtrat est additionné d'alcool à 95° acidifié par de l'acide chlorhydrique (1%) et le précipité déterminé est joint au précédent.

Les matières protéiques diffusées dans la première opération donnent les réactions de précipitation et de coloration des albumines et globulines (celles-ci d'ailleurs en très faible quantité). De plus, le liquide filtré après coagulation par la chaleur présente encore la réaction du biuret ; cette réaction est due à des albumoses, mais non à des peptones car elle est négative après séparation des albumoses au moyen du sulfate d'ammonium en milieu acétique.

L'épuisement par l'eau dans l'appareil de Soxhlet enlève une nouvelle quantité et relativement élevée de protéines.

Le précipité obtenu dans la troisième opération donne également les réactions colorées des matières albuminoïdes. En outre, le produit précipité par l'alcool chlorhydrique de sa solution dans l'acétate de soude présente les propriétés des acides nucléiques : d'une part il réduit la liqueur cupro-alcaline, et chauffé dans un tube à essai avec de l'acide chlorhydrique concentré et un peu de phloroglucine donne une coloration rouge due à la présence d'un groupement sucré ; d'autre part il précipite en jaune par le réactif molybdique après hydrolyse faite à chaud au moyen de l'acide azotique au demi. (L'analyse du groupement prosthétique n'a pu être poussée plus avant à cause de la trop faible quantité de substance disponible.)

Les quantités de matières protéiques cédées par les bacilles en expérience, au cours de ces divers traitements, sont groupées dans le Tableau XVIII. — Au point de vue qualitatif, les mêmes

TABLEAU XVIII.

Matières protéiques extraites des bacilles.

	Bacilles développés sur milieu glycériné			Bacilles développés sur milieu glucosé		
	Souche A	Souche B	Souche C	Souche A	Souche B	Souche C
Poids sec des bacilles en expérience . . :	2 gr. 336	2 gr. 600	2 gr. 190	3 gr. 256	3 gr. 700	3 gr. 370
1° Poids des Extraits aqueux						
a) Macération dans l'eau salée . . . :	0,139	0,145	0,122	0,214	0,288	0,242
b) Epuisement dans l'appareil Soxhlet:	0,303	0,364	0,348	0,661	0,630	0,688
2° Poids de l'Extrait alcalin . . . . . :	0,684	0,841	0,673	1,388	1,557	1,392
Poids de l'Extrait total:	1,126	1,350	1,143	2,263	2,475	2,322
Poids de l'Extrait total pour 100 gr. de bacilles secs . . . . . :	48,2	51,9	52,2	69,5	66,9	68,9

réactions, c'est-à-dire les mêmes produits, furent constatées quel que fût l'aliment ternaire, glycérine ou glucose.

Le pourcentage des protéiques ainsi extraites montre que les bacilles développés sur milieu glucosé donnent une plus grande proportion de ces substances que les bacilles développés sur milieu glycériné. En dosant l'azote total par la méthode de Kjeldahl, on trouve comme moyenne avec les premiers 11 gr. et avec les seconds 8 gr. pour 100 gr. de bacilles secs. Ces nombres, mutipliés par le coefficient 6,25, donnent respectivement 68 gr., 75 et 50 gr. de matières protéiques. Si donc les bacilles nourris avec le glucose sont moins riches en matières grasses, en revanche ils sont plus riches en substances albuminoïdes.

B. — DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES.

Kumagawa et ses élèves ont montré l'imprécision des méthodes de dosage reposant sur l'extraction faite par digestion, ébullition, ou épuisements au moyen de l'appareil de Soxhlet : les extraits bruts ainsi obtenus sont loin parfois de renfermer la totalité des matières grasses ; par contre ils peuvent contenir des substances autres que des graisses, d'où cause d'erreur pour la détermination des constantes physiques et des divers indices. Au surplus elles n'envisagent pas la séparation des acides gras, de l'insaponifiable total, de la cholestérine.

C'est pourquoi dans une seconde série d'expériences destinées à étudier avec plus d'exactitude les corps gras du bacille tuberculeux, et sans me soucier des modifications que pouvaient subir les matières albuminoïdes, j'ai appliqué la technique donnée comme la plus précise : celle proposée par Lemeland et qui serait un perfectionnement de celle de Kumagawa et Suto.

Lemeland en effet, dans une étude critique récente, a reproché à la méthode des deux chimistes japonais de comprendre sous le nom d'acides gras ceux des graisses neutres, des savons, des phosphatides, des éthers de la cholestérine, —

et de donner un chiffre d'insaponifiable total qui englobe sans distinction la cholestérine libre, la cholestérine éthérifiée et les substances insaponifiables de nature indéterminée (insaponifiable X). De plus la technique de KUMAGAWA et SUTO (en particulier la durée et la température de sèchage de l'extrait éthéré) causerait une auto- oxydation des acides gras entraînant non seulement une perte d'acides gras non saturés mais encore des modifications qualitatives importantes de ceux qu'elle conserve et un abaissement des indices d'iode. Enfin la détermination des acides gras par différence entre l'extrait total et l'insaponifiable total, comme opèrent les auteurs japonais, serait inexacte par suite de la présence de substances volatiles dans l'insaponifiable, si bien que toute perte au cours de l'isolement de ce dernier (par exemple en faisant des dessèchements à des températures supérieures à 50°) entraînerait une majoriton des acides gras calculés.

Ces causes d'imprécision ou d'erreur seraient supprimées dans la méthode que LEMELAND indique. J'en rappellerai les temps principaux en les appliquant au bacille tuberculeux. Elle m'a permis de doser l'insaponifiable total et les acides gras, dont j'ai déterminé l'indice d'iode et le point de fusion. En outre, dans l'insaponifiable, j'ai recherché la cholestérine selon la méthode de WINDAUS.

Technique.

1° — **Dosage des matières grasses** (Méthode de LEMELAND :)

a) *Epuisement par l'alcool bouillant.* — A la saponification directe « qui peut n'être pas complète pour des raisons purement mécaniques lorsque les tissus à examiner sont très riches en graisses », LEMELAND préfère la technique de SCHIMIDZU, c'est-à-dire l'extraction alcoolique dans l'appareil de KUMAGAWA, puis la saponification de l'extrait.

Les bacilles, qui avaient été conservés dans l'alcool et dont le poids est connu, sont donc placés dans la cartouche d'un appareil de KUMAGAWA et épuisés par l'alcool à 95°. Cet épuisement a duré 20 heures et fut fait en deux temps séparés par une pulvérisation des bacilles. — La solution alcoolique (à laquelle est joint l'alcool dans lequel avaient séjourné les bacilles) est évaporée à sec sous pression réduite.

b) *Saponification de l'extrait alcoolique.* — L'extrait alcoolique désséché est saponifié 2 heures à reflux avec 25 cm³ de potasse alcoolique binormale. On ajoute ensuite dans le ballon 28 cm³ d'eau distillée, 28 cm³ d'alcool à 95°, 44 cm³ d'acide chlorhydrique normal, réalisant ainsi

un milieu tel que les acides sont à l'état de savons de potasse dans de l'alcool à 50° (la neutralisation partielle de la potasse en excès par l'acide chlorhydrique donne au milieu une alcalinité voisine de N/10) on chauffe $^1/_4$ d'heure à reflux pour assurer la salification des acides gras que l'acide chlorhydrique aurait pu libérer.

c) *Séparation et dosage de l'insaponifiable total.* — Dans une ampoule à décantation on transvase la solution hydro-alcoolique de savons, le ballon est rincé avec de l'éther de pétrole (P. E : 50—60°) qu'on fait passer dans l'ampoule et on épuise à trois reprises avec l'éther de pétrole (au total 250 cm³) qui enlève la totalité des substances insaponifiables. Il est très important de ne faire aucune décantation avant que la séparation des phases ne soit complète et de décanter lentement.

L'éther est évaporé par distillation et le résidu desséché complètement (en plongeant le ballon qui le renferme dans l'eau bouillante pendant 3 à 4 minutes sous pression de 20 millim. de mercure) est redissous dans 10 cm³ d'alcool absolu additionné de 1 cm³ de soude alcoolique décinormale. On évapore l'alcool au bain-marie, on achève le séchage par un séjour de 1 heure dans l'étuve à 50°, puis on couvre le résidu d'éther de pétrole et on laisse au repos 12 heures pour permettre à la partie non soluble d'adhérer à la paroi du verre. On filtre alors sur amiante et sable dans un petit ballon taré. Le filtrat est évaporé et le résidu, après séchage pendant 1 heure à l'étuve à 50°, est pesé : c'est l'insaponifiable total.

d) *Régénération et dosage des acides gras.* — La solution hydro-alcoolique de savons, débarrassée de l'insaponifiable, est étendue de 2 volumes d'eau, acidifiée par de l'acide chlorhydrique pur, puis épuisée dans une ampoule à décantation par le l'éther de pétrole (P. E : 50—60°, 4 épuisements de 100 cm³). Les éthers de pétrole sont recueillis quantitativement dans une autre ampoule à décantation et lavés deux fois avec 100 cm³ d'eau pour éliminer toute trace d'acide chlorhydrique. Ils sont évaporés à siccité comme précédemment et le résidu ainsi désséché est repris par de l'éther de pétrole sec (P. E : 40—50°). Comme précédemment encore la solution d'acides est filtrée sur amiante et sable dans un petit ballon taré ; le solvant est évaporé sous un faible vide, puis le ballon est séché pendant 1 heure à l'étuve à 50° dans un dessicateur où l'on fait le vide. On pèse.

2° — **Contrôle de la méthode** :

Pour savoir si tous les corps gras avaient été extraits, la masse bacillaire, après épuisement par l'alcool, fut saponifiée et le liquide de saponification obtenu fut traité selon la méthode de KUMAGAWA-SUTO.

3° — **Dosage de la cholestérine** (méthode de WINDAUS) :

L'insaponifiable est dissous à l'ébullition dans 10 cm³ d'alcool absolu, puis on ajoute 10 cm³ de solution de digitonine à 1 p. 100 dans l'alcool absolu. On chauffe à nouveau à l'ébullition 1 minute et on ajoute 2 cm³ d'eau distillée qui abaisse le titre d'alcool entre 95 et 90° : il se forme un précipité blanc plus ou moins abondant (lorsqu'il n'existe que de faibles

quantités de cholestérine le précipité n'apparait qu'après refroidissement.) On abandonne au repos 24 heures et on recueille le précipité sur un filtre qui a été taré dans un pèse-filtre. Le précipité est lavé d'abord à l'alcool à 95° puis à plusieurs reprises à l'éther absolu. On sèche à 110—115° pendant $^1/_4$ d'heure environ et on pèse : ce poids représente le complexe digitonine-cholestérine ; la cholestérine s'obtient en le multipliant par 0,2431.

4° — **Indice d'iode** (méthode de HÜBL). :

Cet indice a été recherché par la méthode classique en se servant de chloroforme pour dissoudre les acides gras, d'une solution alcoolique d'iode en présence de chlorure mercurique, et en titrant au moyen de l'hyposulfite de sodium, comparativement avec un témoin, l'iode non combiné.

5° — **Point de fusion** :

Il fut déterminé par la méthode du bain de mercure.

Les recherches ont porté sur deux bacilles du type humain (le bacille Test de l'Institut Pasteur, et un bacille avirulent fourni par le laboratoire de M. BORREL), — et un bacille du type bovin (également donné par le laboratoire de M. BORREL)

Les résultats sont réunis dans le Tableau XIX.

1. — **Valeur de la méthode de LEMELAND dans son application au dosage des graisses du bacille tuberculeux.**

L'examen des résultats montre que l'épuisement à l'alcool bouillant prolongé 20 heures dans l'appareil de KUMAGAWA n'enlève pas la totalité des matières grasses à des bacilles tuberculeux, même longuement pulvérisés après dessication, et l'hydrolyse totale préconisée par KUMAGAWA et SUTO semble donc préférable à la seule technique de SCHIMIDZU.

S'il est exact, comme l'a montré LEMELAND, que la saponification peut n'être pas complète lorsque les tissus à examiner sont très riches en graisses, l'épuisement à l'alcool employé seul, qu'il préfère, ne parait pas non plus devoir être, dans tous les cas, à l'abri de la critique. Une quantité parfois importante de substances grasses échappe au solvant, comme il ressort de l'examen des valeurs ci-dessous (Tableau XX), reprises du Tableau XIX.

Ainsi, même après une extraction de 20 heures par l'alcool bouillant dans l'appareil de KUMAGAWA, extraction faite en deux fois, la seconde opération étant précédée par un broy-

TABLEAU XIX.

Substances grasses et lipoïdiques du bacille tuberculeux.

	Bacilles type humain				Bacilles type bovin
	développés sur milieu glycériné		développés sur milieu glucosé		développés sur milieu glucosé
Origine :	I Test de l'I. P.	II Race Borrel	I Test de l'I. P.	II Test de l'I. P.	Race Borrel
Age de la culture :	20 jours	50 jours	20 jours	25 jours	20 jours
Poids de bacilles frais mis en expérience :	5 gr. 624	7 gr. 01	10 gr. 400	9 gr. 759	4 gr. 916
Poids de bacilles secs :	0,793	1,210	1,768	1,620	0,826
Extrait alcoolique :	0,281	0,302	0,359	0,353	0,256
Acides gras :	0,1775	0,242	0,1655	0,140	0,1275
Insaponifiable total :	0,078	0,0425	0,043	0,104	0,059
Substances grasses et lipoïdiques totales obtenues par saponification du résidu d'extraction :	0,024	0,030	0,0498	0,041	0,0244
Cholestérine :	0,0036	0,0029	0,0028	0,0034	0,0034
Indice d'Iode :	20,02	19,26	16,62	16,73	14,30
Point de Fusion :	46°	»	47°	47°	47°5

TABLEAU XX.

Valeur de la méthode de Lemeland appliquée au bacille tuberculeux.

		Bacilles type humain				Bacilles type bovin développés sur milieu glucosé
		développés sur milieu glycériné		développés sur milieu glucosé		
		I	II	I	II	
Total des substances grasses et lipoïdiques (ac. gras + insaponif.) présentes	dans l'extrait alcoolique . :	0,2555	0,2845	0,2085	0,244	0,1865
	dans le résidu d'extraction :	0,024	0,030	0,0498	0,041	0,0244
	Total :	0,2795	0,3145	0,2583	0,285	0,2109
Pourcentage de la totalité des substances grasses et lipoïdiques	dans l'extrait alcoolique :	92 %	90 %	80 %	85 %	88 %
	dans le résidu d'extraction :	8 %	10 %	20 %	15 %	12 %

age de la substance sèche, il reste encore 10 à 20% de matières grasses suivant les cas.

La méthode d'extraction alcoolique ne suffit donc pas à elle seule et l'obtention de valeurs exactes exige la saponification du résidu d'extraction.

Il est très vraisemblable d'ailleurs qu'ils s'agit là d'un fait propre au bacille tuberculeux dont on sait la très grande résistance qu'il offre aux agents d'extraction. Les essais faits il y a quelques années à l'aide de la méthode de KUMAGAWA-SCHIMIDZU par TERROINE sur le sang ont permis en effet de constater que, dans ce cas, le résidu d'extraction alcoolique ne renfermait après 8 heures d'épuisement pas plus de 2,3% d'acides gras totaux. Il ne parait donc pas douteux que la méthode de LEMELAND, qui réalise sur celle de KUMAGAWA une économie de temps et de solvant et supprime de nombreuses causes d'inexactitude, prouve dans la plupart des cas sa supériorité ; elle est défectueuse, pour la partie extraction, en ce qui regarde le bacille tuberculeux.

2. — **Teneur des bacilles en substances grasses.**

Les quantités de matières grasses restant dans le résidu d'extraction étant trop faibles pour tenter avec sécurité une séparation des acides gras et de l'insaponifiable, je me contenterai de donner les résultats séparément acquis par chaque technique. Ces résultats sont rassemblés dans le Tableau XXI.

On voit qu'en substituant le glucose à la glycérine comme aliment ternaire, et à égalité d'apport de carbone, toutes les autres conditions étant identiques, on détermine un abaissement de la teneur en substances grasses voisine de 60 pour 100.

Les cultures âgées de 25 jours accusent relativement à celles âgées de 20 jours, tous les autres facteurs demeurent les mêmes, une augmentation en matières grasses voisine de 3 grammes pour 100 grammes de bacilles secs. Cet accroissement de la proportion des corps gras au cours du développement est un fait connu et qu'ARONSON indiqua. Mais des expériences en série restent à faire pour en fixer les limites.

TABLEAU XXI.

Teneur du bacille en substances grasses.

(valeurs rapportées à 100 gr. de bacilles secs.)

		Bacilles type humain				Bacilles type bovin développés sur milieu glucosé
		développés sur milieu glycériné		développés sur milieu glucosé		
		I.	II.	I.	II.	
Substances grasses contenues dans l'extrait alcoolique traité par la méthode de *Lemeland*	Acides gras	22,38	20,0	9,36	8,64	15,43
	Insaponifiable . . .	9,83	3,51	2,43	6,41	7,14
	Total	32,21	23,51	11,79	15,05	22,57
Substances grasses totales extraites du résidu d'extraction par la méthode de *Kumagawa*		3,0	2,47	2,81	2,52	2,95
Total général		35,21	25,98	14,60	17,57	25,52

Dans des conditions de culture identiques, les bacilles tuberculeux d'origine bovine ont une teneur en matières grasses deux fois plus élevée que les bacilles d'origine humaine. [1])

3. — **Présence et taux de la cholestérine.**

L'examen du Tableau XIX montre que le traitement de l'insaponifiable total par la digitonine n'a donné que des quantités très faibles de complexe ; toutefois ce complexe s'est parfaitement formé dans les conditions habituelles de sa préparation.

La très petite quantité du complexe ainsi obtenue ne permettait pas de rechercher les constantes physiques après séparation et cristallisation de la cholestérine. Mais du moins ai-je pu observer qu'une solution chloroformique du complexe recueilli donne avec la plus grande netteté et immédiatement la réaction de SALKOWSKI et celle de LIEBERMANN-BURCHARD. Or, l'alcool supérieur qui constitue la majeure partie de l'insaponifiable et que SAKAE TAMURA isola et appela mykol ne fournit aucune des réactions de la cholestérine. (La digitonine ne les donne d'ailleurs pas davantage).

La présence de la cholestérine parait donc incontestable mais, comme il ressort des chiffes ci-dessous, le taux en est très faible :

---

[1]) Les travaux récents de FROUIN confirment certains de ces résultats. Ce savant reconnut que les bacilles du type bovin de diverses origines, ainsi que les bacilles du type aviaire, cultivés sur liquide nutritif chimiquement défini avec glycérine comme aliment ternaire, sont tous plus riches en graisses que les bacilles humains développés sur le même milieu, — et que parmi les bacilles bovins eux-mêmes il y a, selon leur origine, des différences pouvant aller du simple au double. Les recherches furent faites en employant comme solvant l'alcool bouillant dans un appareil de KUMAGAWA. Cultivés sur bouillon peptoné glycériné les bacilles auraient un taux plus élevé de matières solubles dans l'alcool (35 gr. au lieu de 25 gr. pour 100 gr. de bacilles secs).

FROUIN constata en outre que si l'on substitue à la glycérine un mélange de glucose et de mannite (cf. page 38), l'extrait alcoolique de ces divers types de bacilles diminue de 60 à 80 pour 100, diminution accrue encore par l'addition de sels de terres rares du groupe cérique. Mais dans ces examens comparatifs, FROUIN ne dosa que la totalité des matières solubles dans l'alcool, sans déterminer quantitativement les acides gras et l'insaponifiable.

ALILAIRE et FERNBACH qui ont cultivé des bacilles tuberculeux d'origine humaine et bovine sur bouillon non glycériné ou renfermant de la gomme arabique en place de glycérine, ont noté de même une diminution de 70 pour 100 environ de matières grasses, extraites par un mélange de chloroforme et d'éther.

Cholestérine en p. 100 des bacilles secs :	Bacilles type humain développés sur milieu glycériné I	Bacilles type humain développés sur milieu glycériné II	Bacilles type humain développés sur milieu glucosé I	Bacilles type humain développés sur milieu glucosé II	Bacilles type bovin développés sur milieu glucosé
	0,45	0,24	0,16	0,21	0,41

Nous sommes loin des chiffres indiqués par BAUDRAN. On remarquera en outre que le taux des bacilles en cholestérine est très variable.

4. — **Rapport quantitatif des diverses substances grasses et lipoïdiques entre elles.**

Pour établir exactement les rapports existant entre les trois grands constituants des matières grasses, acides gras totaux, insaponifiable, cholestérine, il eût fallu faire la détermination de ces trois groupes aussi bien sur le résidu de l'extraction alcoolique que sur l'extrait lui-même.

Bien qu'elle n'ait été faite que sur l'extrait, on peut cependant avoir, puisqu'il s'agit de rapports et non de valeurs absolues, une image assez fidèle de la répartition des diverses substances grasses. Cette image apparait dans le Tableau XXII.

TABLEAU XXII.

Proportion des acides gras, de l'insaponifiable total et de la cholestérine par rapport à la totalité des substances grasses et lipoïdiques.

	Bacilles type humain développés sur milieu glycériné I	Bacilles type humain développés sur milieu glycériné II	Bacilles type humain développés sur milieu glucosé I	Bacilles type humain développés sur milieu glucosé II	Bacilles type bovin développés sur milieu glucosé
Acides gras	69 %	85 %	79 %	57 %	67 %
Insaponifiable total	31 –	15 –	21 –	43 –	23 –
Cholestérine . . .	1,3 –	1,0 –	1,3 –	1,3 –	1,8 –

Ce qui frappe immédiatement, c'est la proportion toujours élevée et extrêmement variable de l'insaponifiable total, sans qu'il soit possible de rapporter ces variations à une cause quelconque.

Par contre, chez une même espèce, la proportion de cholestérine est remarquablement constante ; elle change lorsqu'on passe à une bacille d'origine différente.

En tout cas, il n'y a là aucun phénomène en rapport avec la nature de l'alimentation.

5. — **Indices caractéristiques des acides gras.**

Au point de vue qualitatif, les graisses des bacilles développés sur milieu glycériné paraissent renfermer une proportion légèrement plus grande d'acides gras non saturés que les acides provenant du milieu glucosé : leur indice d'iode est en effet un peu plus élevé. — Par contre, les points de fusion sont sensiblement les mêmes.

6. — **Composition globale des bacilles.**

Ayant fait par ailleurs la détermination des teneurs en eau et en azote des bacilles , il est facile de calculer à l'aide de l'ensemble des données acquises leur composition globale et voir ainsi quelle influence la nature de l'alimentation hydrocarbonée exerce sur cette composition. Les résultats sont réunis dans le Tableau XXIII.

Ces résultats sont comparables à ceux qu'avait donnés la première série d'expériences.

A noter d'autre part l'enrichissement en *substances hydrocarbonées* que paraissent montrer les vieilles cultures : la totalité de l'eau, des matières protéiques et des matières grasses n'atteint que 95,7 pour 100 dans les cultures âgées de 50 jours ; elle est de 98 pour les bacilles âgés de 20 jours développés sur le même milieu, — ce qui représenterait 2 gr. de substances hydrocarbonées chez ceux-ci, 4 gr. chez celles-là. D'ailleurs les bacilles développés sur milieu glucosé paraissent également un peu plus riches en substances hydrocarbonées que les bacilles du même âge et de même race développés sur milieu glucosé.

TABLEAU XXIII.

Composition globale des bacilles frais.

	Bacilles type humain			
	développés sur milieu glycériné		développés sur milieu glucosé	
	I	II	I	II
Age de la culture . . . . . :	20 jours	50 jours	20 jours	25 jours
Teneur en eau . . . . . :	85,9	82,7	83,0	83,4
Teneur en matières protéiques (Az total × 6,25) . . . . . :	7,5	8,5	11,84	11,3
Teneur en substances grasses et lipoïdiques (ac. gras + insaponifiable) . . . . . :	4 9	4,48	2,4	2,3
Total . . . :	98,3	95,68	97,24	97

Les conclusions générales qui se dégagent de ces deux séries d'expériences, c'est que chez les bacilles humains de même race la teneur en matières grasses diminue dans une proportion de 60% environ lorsqu'on substitue le glucose à la glycérine, toutes les autres conditions demeurant identiques.

La prétendue particularité chimique du bacille tuberculeux, à savoir sa teneur très élevée en corps gras, n'en est donc pas une, en tout cas elle n'est pas absolue : ce n'est pas une constante cellulaire, mais elle porte la marque alimentaire et dépend de la nature de l'aliment ternaire *même à égalité d'apport de carbone.* Une part de cette graisse constituerait donc dans certains cas une réserve. Il serait intéressant de voir avec un microorganisme moins délicat et plus maniable si, mise en inanition hydrocarbonée, la culture continue à vivre aux

dépens des matières grasses emmagasinées et jusqu'à quelles limites celles-ci diminuent.

Mais il y a plus : la source d'azote demeurant la même en qualité et en quantité, la nature de l'aliment hydrocarboné qui provoque une diminution du taux des graisses chez le bacille tuberculeux amène un accroissement parallèle de sa teneur en azote de telle sorte que les substances grasses et les substances protéiques s'équilibrent et que leur total demeure sensiblement constant. Ici encore il serait intéressant de voir avec des bacilles plus souples si une culture normale mise en inanition azotée consomme ses protéiques comme en physiologie animale et comme du reste Terroine, Wurmser et Montané l'ont constaté chez le *Sterignatocystis*.

Ces variations que la nature de l'aliment détermine chez le bacille tuberculeux font que, dans certaines conditions de culture, sa constitution chimique se rapproche *quantitativement* de celle présentée, d'après les analyses de Nicolle et Alilaire, par la plupart des microbes pathogènes.

Il n'en conserve pas moins d'ailleurs ses propriétés histochimiques particulières, sa résistance spéciale vis-à-vis de certains agents chimiques et physiques, comme nous l'allons voir dans le Chapitre suivant.

CHAPITRE IV.

PROPRIÉTÉS DU BACILLE TUBERCULEUX SA RÉSISTANCE A CERTAINS AGENTS CHIMIQUES ET PHYSIQUES.

1.

COLORATION. ACIDO-RÉSISTANCE ET ALCOOLO-RÉSISTANCE.

Le bacille tuberculeux présente vis-à-vis des couleurs basiques d'aniline deux propriétés corrélatives fondamentales sur lesquelles repose la technique spéciale employée pour sa recherche :

1°) — C'est d'abord comparativement aux autres microbes la difficulté avec laquelle il se laisse pénétrer par ces couleurs ;

2°) — C'est ensuite la puissance avec laquelle il retient, une fois coloré, la matière colorante et en particulier la résistances qu'il offre à la décoloration par le acides et l'alcool. De là l'épithète « d'acido-résistant » qui lui est particulièrement donnée, — épithète qui fut étendue à des bacilles trouvés dans le lait, le beurre, le fumier, sur les graminées, dans le smegma, parce que, colorés comme le bacille tuberculeux, ils présentaient plus ou moins la même propriété histo-chimique.

Koch avait bien reconnu la première de ces propriétés ; il avait vu aussi combien le bacille retenait puissamment le colorant, mais il ne soupçonna ni son acido ni son alcoolo-résistance. Il se contentait après coloration par une solution alcalinisée de bleu de méthylène, de laver simplement à l'eau puis de plonger les préparations pendant 1 /4 d'heure environ dans une solution aqueuse saturée de vésuvine : la couleur brune se substituait alors à la teinte bleue primitive dans tous les éléments retenant faiblement le colorant (éléments histolo-

giques, microorganismes autres que le bac. tuberculeux), tandis que cette teinte bleue persistait sur le bacille tuberculeux.[1])

Les solutions simplement aqueuses de couleurs basiques d'aniline dont WEIGERT avait le premier recommandé l'emploi pour la coloration des bactéries sont insuffisantes ; en particulier j'ai constaté qu'une solution aqueuse de bleu de méthylène de même concentration que celle employée par KOCH, moins l'alcali, n'arrive pas à colorer suffisamment le bacille tuberculeux même au bout de 48 heures, ce qui explique l'insuccès des recherches de VILLEMIN.

Au contraire la puissance colorante des solutions alcalines introduites en bactériologie par KOCH est considérable, toutefois de telles solutions nuisent aux préparations ; de plus elles s'altèrent rapidement. A la potasse que KOCH avait ainsi employée comme mordant, EHRLICH substitua une autre base : l'aniline. Ce choix résultait d'une observation faite par EHRLICH à savoir que le violet de méthyle très pur colorait moins intensément les microbes que cette même substance non purifiée (violet de gentiane) et dont l'impureté était probablement l'aniline.

Mais si les solutions colorantes à l'eau anilinée n'ont pas pour les préparations les inconvénients des solutions alcalines par contre elles s'altèrent tout aussi vite.

Les solutions phéniquées que préconisa ZIEHL ont l'avantage de se conserver plusieurs mois. Comme matière colorante, ce bactériologiste se servit de la fuschine qui a une grande puissance tinctoriale, et le phénol joue à la fois le rôle de mordant et d'antiseptique.[2]) D'autres mordants, l'essence de térébenthine (PRIOR), le thymol (BRIEGER), l'ammoniaque (WEIGERT), le borax (SAHLI), furent aussi essayés. Mais c'est la solution phéniquée de ZIEHL qui demeure le colorant classique généralement employé aujourd'hui.

---

[1]) Le procédé de coloration employé par KOCH n'a plus qu'un intérêt historique : il immergeait les préparations pendant 24 heures dans le bain suivant :

Solution alcoolique sat. de Bleu de méthylène	1 c.c.
Solution aqueuse de potasse à 10 %	2 –
Eau distillée	200 –

[2]) Solution phéniquée de ZIEHL modifiée par NELSEN (qui dans la formule primitive de ZIEHL quadrupla la quantité de fuschine)

Fuschine . . .	1 gr.
Alcool 100° . .	10 c.c.
Phénol crist . .	5 gr.
Eau dist. q. s. p. .	100 c.c.

La coloration peut se faire à chaud en soumettant les préparations 10 minutes environ à l'action de la solution de Ziehl fumante ; — ou à froid en les laissant immergées dans la solution un temps beaucoup plus long, mais qu'il n'est nullement utile de prolonger 12 heures ou plus, comme l'indiquent généralement les Traités.

Ce fut Ehrlich qui, le premier, indiqua la résistance du bacille à la décoloration par les acides et il employa comme agent décolorant l'acide azotique au 1/3 ; Ziehl et Nelsen se servirent de l'acide sulfurique au 1/4 ; Orth utilisa l'acide chlorhydrique au 1/10. Pour ménager les autres éléments des préparations, un grand nombre de bactériologistes firent usage d'acides moins énergiques : acide acétique (Petri) ; acide formique (Watson et Cheyne) ; acide oxalique (Cornil, Alvarez, Tavel) ; acides tartrique, citrique, lactique à 5 ou 10 % (Hauser) ; acide borique en solution glycéro-alcoolique (Bayard). Kuhne décolora par l'alcool seul après action d'un agent sensibilisateur : le chlorhydrate d'aniline (méthode rapportée par Borrel). D'autres décolorants furent encore indiqués, plus ou moins heureux : le bicarbonate de soude en solution alcoolique ou l'eau oxygénée (Muller) ; l'hydrate de chloral et l'iodure de potassium également en solution alcoolique (Gasis) ; le bisulfite de soude (Konrich), etc... Mais ces méthodes si elles sont moins brutales sont aussi moins électives.

Si l'on recolore ensuite par le bleu de méthylène [1]) on a des préparations très nettes où seuls les bacilles tuberculeux se détachent en rouge vif sur les autres éléments qui, ayant été décolorés par l'acide, se recolorent en bleu pâle.

Il est généralement indiqué dans les Traités qu'après coloration par le liquide de Ziehl les préparations doivent être plongées quelques secondes dans l'acide puis, après lavage à l'eau, agitées rapidement dans de l'alcool pour parfaire la décoloration des divers éléments autres que le bacille tuberculeux.

La crainte de décolorer le bacille lui-même si l'on prolonge au delà de quelques secondes le séjour de la préparation dans

[1]) Séjour de 1 minute dans une solution ainsi faite :

Solut. alcooliq. saturée de Bleu de méthylène . .	XX gouttes
Eau dist.	30 c.c.

l'acide n'est pas justifiée ; elle expose en outre à de fâcheuses erreurs à cause de la confusion qu'elle permet avec d'autres bacilles non pathogènes jouissant aussi d'un certain degré d'acido-résistance et qui, demeurant colorés après ce court passage dans l'acide, peuvent alors en imposer pour le bacille tuberculeux (bacilles trouvés dans le smegma p. ex.).

Pour me rendre compte si les bacilles développés sur milieu glucosé, et dont la composition chimique se trouve par là-même très modifiée, perdaient plus ou moins, de ce fait, les propriétés classiques que le bacille tuberculeux possède vis-à-vis des décolorants, j'ai tout d'abord recherché les limites de l'acido-résistance et de l'alcoolo-résistance du bacille développé sur milieu glycériné.

Technique.

Les préparations furent faites avec des bacilles humains pris soit dans des voiles jeunes (10-12 jours) soit dans des colonies âgées de 1 mois.

La fixation fut assurée au moyen de la glycérine albumineuse et de l'alcool-éther. Enfin la coloration se fit avec la liqueur de Ziehl à froid ou à chaud et le fond de la préparation fut, après décoloration, recoloré comme il a été dit avec le bleu de méthylène.

Chaque préparation après repérage de champs convenables fut soumise successivement à des durées croissantes de décoloration par l'acide. L'examen fut fait avec l'huile de cèdre mise directement sur la lame sans lamelle couvre-objet pour éviter de rayer le frottis ou d'en entraîner des fragments au cours des recouvrements successifs. Après chaque examen l'huile de cèdre était enlevée par quelques gouttes de xylol et la préparation parfaitement sèche était plongée à nouveau dans l'acide sulfurique au $^1/_4$. (Je m'étais assuré au préalable qu'un séjour même d'une ½ heure dans le xylol ne modifiait en rien la coloration).

Les résultats de mes recherches sont réunis dans les Tableaux XXIV, XXV et XXVI.

J'avais pensé que la somme arithmétique des temps de décoloration successifs, soit une ½ heure, ne représentait peut-être pas la durée d'action réelle de l'acide et qu'il y avait en quelque sorte, à chaque plongée dans le décolorant, un temps perdu pendant lequel l'acide avait à pénétrer et imprégner de nouveau le corps bacillaire. Mais en realité je n'ai pas constaté de différence sensible entre les résultats consignés dans

TABLEAU XXIV

Résistance à la décoloration par l'acide sulfurique au $^1/_4$ du bacille coloré par un séjour de 1 heure dans le liquide de Ziehl froid.

Préparations		Nombre de bacilles colorés dans un même champ repéré : avant décoloration	après décoloration de 15 sec.	30 sec.	1 min.	2 min.	3 min.	5 min.	10 min.	15 min.	30 min.
Cultures âgées de 10 jours	N° 1	12	12	12	12 la plupart r. p. ou v.		tous violacés ou bleutés				
	– 2	14	14	14	14						
	– 3	15	15	15	15						
Cultures âgées de 4 à 5 semaines	– 4	12	12	12	12	12 r. p.	9 v.	7	7	5	5 v. p.
	– 5	11	11	11	11, dont 2 r. p.	9 id.	9 v.	6	6	6 v. p.	5 id.
	– 6	15	15	15	15, dont 3 r. p.	10 id.	11 v.	10	10	10	8 id.

Abréviations :
- r. = bacilles colorés en rouge
- r. p. = « « en rouge pâle
- v. = « « en violet
- v. p. = « « en violet pâle

Les bacilles colorés en bleu pâle, plus ou moins visibles, ne sont pas comptés.

TABLEAU XXV.

Résistance à la décoloration par l'acide sulfurique au $^1/_4$.
du bacille coloré par un séjour de 2 heures dans le liquide de Ziehl froid.

Préparations		Nombre de bacilles colorés dans un même champ repéré : avant décoloration	après décoloration de 15 sec.	30 sec.	1 min.	2 min.	3 min.	5 min.	10 min.	15 min.	30 min.
Cultures âgées de 10 jours	N° 1	10	10	10	10	10 la plupart r. p. ou v.		4 v.	3 v. p.		
	– 2	9	9	9	9	9		5 v.	3 id.		
	– 3	14	14	14	14	14		6 v.	4 id.		
Cultures âgées de 4 à 5 semaines	– 4	16	16	16	16	16, dont 1 r. p.	16	14 v.	13	10	10 v. p.
	– 5	11	11	11	11	11	11	11 v.	11	9	8 id.
	– 6	15	15	15	15	15	15	15 v.	15	12	11 id.

Mêmes abréviations qu'au Tableau XXIV.

TABLEAU XXVI.

Résistance à la décoloration par l'acide sulfurique au $^1/_4$ du bacille coloré par un séjour de 10 minutes dans le liquide de Ziehl fumant.

Préparations		Nombre de bacilles colorés dans un même champ repéré : avant décoloration	après décoloration de 15 sec.	30 sec.	1 min.	2 min.	3 min.	5 min.	10 min.	15 min.	30 min.
Cultures âgées de 10 jours	N° 1	11	11	11	11 certains r. p.	8 v. p.	5	Tous plus ou moins bleutés			
	– 2	13	13	13	13 id.	7 id.	7	id.			
	– 3	15	15	15	15 id. et 2 v.p.	10 id.	5	id.			
	– 4	21	21	21	21 id. et 4 v.p.	13 id.	9	id.			
	– 5	15	15	15	15 id. et 3 v.p.	9 d.	8	id.			
Cultures âgées de 4 à 5 semaines	– 6	9	9	9	9	9 r.	9	8	7	7	3 v. p.
	– 7	12	12	12	12	11 r.	11	7	5	5	5 id.
	– 8	10	10	10	10	10 r.	8	6	5	5	5 id.
	– 9	18	18	18	18, dont 1 r. p.	16 r., 2 v.	16	14	10	10	8 id.
	– 10	13	13	13	13	11 r.	11	11	9	9	7 id.

la plupart violacés

Mêmes abréviations qu'au Tableau XXIV.

les Tableaux et ceux obtenus en laissant d'emblée les préparations pendant 2, ou 3, ou 10, ou 30 minutes continues dans l'acide.

Naturellement, pour que ces résultats fûssent aussi comparables que possible, les préparations mises en expérience dans ces divers essais (décoloration après coloration à chaud, décoloration après coloration à froid, décolorations fractionnées ou faites en une seule fois) provenaient des mêmes cultures.

De l'examen de ces Tableaux il ressort d'abord que la coloration faite à froid (2 heures et même 1 heure) apparait comme plus tenace, plus résistante à l'action de l'acide que la coloration faite à chaud (10 min.) Cette différence d'acido-résistance se manifeste très nettement si, sur une même lame, une moitié de la préparation est colorée 2 heures à froid et l'autre 10 minutes à chaud, les temps de décoloration demeurant les mêmes.

Il ressort ensuite que la coloration faite à froid par un séjour de 2 heures dans le liquide de Ziehl résiste certainement au moins 1 minute à l'action de l'acide sulfurique au $^1/_4$. Le Tableau XXV montre qu'elle résiste même très bien, à part chez les bacilles jeunes, 2 et même 3 minutes au bain acide. Si on immerge ensuite pendant 2 heures les préparations dans le Bleu de Kuhne, les bacilles apparaissent encore très rouges sauf ceux dont la coloration rouge avait pâli et qui sont alors bleutés. Quelques uns même, mais rares, dans l'étendue de la préparation sont devenus franchement bleus avec des granules polaires ou centraux plus foncés.

Notons qu'un séjour de 5 minutes dans la solution de Ziehl à froid suffit déjà pour colorer le bacille tuberculeux, toutefois le passage consécutif de 15 secondes dans l'acide sulfurique au $^1/_4$ ne laisse plus que des bacilles teintés d'un rouge pâle. Ils demeurent encore très rouges au contraire si le colorant a agi 10 minutes ; mais ensuite si on prolonge l'action de l'acide pendant 1 minute la coloration de la plupart d'entre eux est passablement atténuée, et après 2 minutes il n'y a plus aucun bacille visible.

Enfin si l'on maintient pendant 10 heures l'immersion dans le liquide de Ziehl à froid, tous les bacilles apparaissent encore teintés d'un rouge très vif et nullement modifié après un séjour d'une $^1/_2$ heure dans l'acide sulfurique au $^1/_4$.

Bezançon et Philibert ont fait de semblables recherches sur l'acido-résistance en se servant de l'acide azotique au $^1/_3$ ayant coloré pendant 10 minutes par la solution de Ziehl fumante un très grand nombre de préparations faites avec des expectorations de tuberculeux, ils observèrent que la coloration des bacilles résistait à 2 minutes d'immersion dans l'acide, — et ils ont conclu que l'on doit prendre comme critérium du degré d'acido-résistance du bacille tuberculeuxu ne résistance minima de 2 minutes à l'action de l'acide azotique au $^1/_3$. Cette base est trop absolue si l'on emploie l'acide sulfurique au $^1/_4$ puisque, comme le montre le Tableau XVI certains bacilles dans les préparations sont décolorés au bout de la 2me minute. En réalité elle semble trop absolue aussi avec l'acide azotique au $^1/_3$: ayant en effet repéré des bacilles colorés sur diverses préparations et les ayant ensuite soumis à l'action de cet acide pendant 2 minutes, j'ai constaté que la coloration de certains ne résistait pas.

(Les auteurs n'ont fait aucun essai de coloration à froid).

Quant à la résistance à la décoloration par l'alcool, elle est très grande quel que soit l'âge de la culture, comme l'indique le Tableau XXVII.

Les résultats sont identiques, que la coloration ait été faite à chaud ou à froid.

En conséquence, j'ai choisi comme base de la coloration un séjour de 2 heures dans le liquide de Ziehl froid, — et comme temps de décoloration, 1 minute dans l'acide sulfurique au $^1/_4$ et 5 minutes dans l'alcool à 95°.

Cette technique strictement appliquée aux bacilles développés sur milieu glucosé, toutes les autres conditions de culture étant identiques, m'a montré que, dans l'ensemble, ces bacilles jouissaient des mêmes propriétés que ceux développés sur milieu glycériné.

Ferran, par modification des milieux de culture, en particulier par suppression de la glycérine, aurait obtenu des bacilles qui n'étaient plus acido-résistants. Vaudremer, en cultivant sur gélose ordinaire non glycérinée ou sur gélose glucosée certains bacilles tuberculeux humains et bovins, aurait

TABLEAU XXVII.

Résistance à la décoloration par l'alcool à 95° du bacille tuberculeux coloré par le liquide de Ziehl.

Préparations		Nombre de bacilles colorés, dans un même champ repéré, après une décoloration de: 1 minute dans l'ac. sulfurique au 1/4	½ heure dans l'alcool 95°
Cultures jeunes (10 jours)	N° 1	16	16 aussi intensément colorés qu'au sortir de l'ac. sulfurique.
	— 2	12	12 — id. —
	— 3	19	19 — id. —
	— 4	15	15 — id. —
Cultures âgées (1 mois)	N° 1	11	11 — id. —
	— 2	17	17 — id. —
	— 3	11	11 — id. —
	— 4	22	22 — id. —
	— 5	18	18 — id. —

remarqué de même qu'ils perdaient leur acido-résistance pour la reprendre ensuite quand on les réensemençait sur des milieux glycérinés. Dans mes très nombreux essais, répétés dans des conditions très rigoureuses, avec des bacilles développés sur mon milieu chimiquement défini au glucose, je n'ai jamais fait semblable constatation.

Si ces bacilles sont notablement moins riches en substances grasses totales que les bacilles développés sur milieu glycériné, nous avons vu qu'ils renferment par contre une proportion d'acides gras libres plus élevée, et ceci peut compenser cela puisque ce sont principalement les acides gras libres et non les graisses neutres qui sont doués d'acido-résistance.

J'ai fait des essais comparatifs de coloration avec la fuschine, le violet de gentiane et le bleu de méthylène, soumettant ensuite les bacilles colorés à une décoloration uniforme de 1 minute dans l'acide sulfurique au $^1/_4$ et 5 minutes dans l'alcool à 95°, (toutes les colorations furent faites à froid).

Voici les résultats :

A. — *Essais avec les solutions phéniquées* (formule p. 143)

a. Fuschine phéniquée

Temps de coloration	
½ heure :	Bacilles très visibles, quoique d'une coloration un peu pâle.
1 heure :	Bacilles très visibles, très rouges.

Fuschine, marque Grübler.
dont la solubilité à saturation dans l'alcool absolu est : 4 gr. 50 à 4 gr. 70% ; et la solubilité à saturation dans l'eau distillée est : 0 gr. 60 à 0 gr. 80 %

b. Violet de gentiane phéniqué

Temps de coloration	
1 heure :	Bacilles déjà visibles, mais d'une coloration très pâle.
2 heures :	Bacilles bien visibles, quoique d'une coloration un peu pâle.
3 heures :	Bacilles très nets, violet foncé.

Violet de gentiane, marque Grübler,
dont la solubilité à saturation dans l'alcool absolu est : 3 gr. à 4 gr. %.
et la solubilité à saturation dans l'eau distillée est : 1,5 à 1,7%.

c. Bleu de méthylène phéniqué

Temps de coloration	
1 heure :	Insuffisant.
2 heures :	Bacilles visibles, mais d'une coloration pâle.
3 heures :	Bacilles nets, mais leur coloration demeure pâle.

Bleu de méthylène, marque Grübler,
dont la solubilité à saturation dans l'alcool absolu est : 1 gr. 70 à 1 gr. 80 %.
et la solubilité à saturation dans l'eau distillée est : 1 gr 50 à 1 gr. 80 %.

B. — *Essais avec les solutions non phéniquées.*

	Temps de coloration		
a. Fuschine	5 heures	— Avant décoloration :	Bacilles visibles, mais faiblement colorés.
		— Après décoloration :	— id. —
b. Violet de gentiane	8 heures	— Avant décoloration :	Bacilles visibles, mais faiblement colorés.
		— Après décoloration :	— id. —
c. Bleu de méthylène	14 heures	— Avant décoloration :	Bacilles très faiblement colorés, à peine visibles ; (coloration peu différente d'ailleurs de celle obtenue au bout de 10 heures).
		— Après décoloration :	— id. —

Ainsi, avec les solutions phéniquées à 5% et toutes choses égales d'ailleurs, si l'on veut établir une échelle de la puissance tinctoriale de la fuschine, du violet de gentiane et du bleu de méthylène vis-à-vis du bacille tuberculeux, on aura approximativement les coefficients suivants :

le pouvoir tinctorial de la fuschine étant . . . 20,
celui du violet de gentiane est 5,
celui du bleu de méthylène est . . . . . 3.

Quant aux solutions colorantes sans mordant, elles nécessitent pour colorer le bacille un temps d'imprégnation très long, même lorsqu'elles sont relativement concentrées : après 5 heures d'immersion dans la solution de fuschine non phéniquée froide, les bacilles n'apparaissent que faiblement teintés ; avec le bleu de méthylène, si prolongée que soit la durée de son action, on n'arrive jamais à colorer fortement le bacille tuberculeux.

2.

ACTION DE LA SOUDE, DE L'ACIDE SULFURIQUE, DE L'ACIDE CHROMIQUE.

Action de la Soude. — Au bout de 40 jours de macération dans une solution de soude caustique à 10%, les bacilles (nullement détruits au point de vue structural) se colorent encore par le liquide de Ziehl, et l'alcoolo-résistance

ainsi que l'acido-résistance sont conservées : des bacilles repérés avant décoloration se sont montrés encore parfaitement colorés après 1 minute de séjour dans l'acide sulfurique au $^1/_4$; ils ont toutefois une facilité plus grande à se surcolorer en bleu après la double coloration, aussi la couleur est-elle d'un rouge moins vif, un peu violacé [1]).

Action de l'Acide sulfurique. — Si l'on plonge 1 minute dans l'acide sulfurique concentré (D : 1,84) des lames porte-objet sur lesquelles on a étalé puis fixé par la chaleur une parcelle de culture délayée au préalable dans de l'eau glycérinée-albumineuse, et qu'ensuite, après lavage minutieux et séchage, on les colore par le liquide de Ziehl (2 heures à froid), on constate les faits suivants :

1) — au sortir du liquide de Ziehl, après simple lavage à l'eau, toutes les lames montrent à l'examen microscopique de nombreux bacilles très rouges ;

2) — sur une lame passée 5 minutes dans l'alcool à 95°, les bacilles sont décolorés ou pour le moins teintés seulement d'un rose très pâle : on les devine plus qu'on ne les voit. Donc perte de l'alcoolo-résistance ;

3) — sur une lame passée 1 minute dans l'acide sulfurique au $^1/_4$, les bacilles sont complètement décolorés. Donc perte de l'acido-résistance ;

4) — sur une lame passée 1 minute dans le Bleu de Kuhne, tous les bacilles sont bleus. Nous avons déjà vu d'ailleurs (Tableau XXV) que l'action croissante de l'acide sulfurique au $^1/_4$ permettait la coloration en bleu de certains bacilles par passage de 1 minute dans une simple solution aqueuse de bleu de méthylène.

Inversement si une préparation qui a été ainsi en contact 1 minute avec l'acide sulfurique concentré est plongée 1 minute dans le Bleu de Kuhne, tous les bacilles apparaissent en bleu ; mais si on la plonge ensuite 1 minute dans le liquide de Ziehl, la fuschine se substitue au bleu et les bacilles apparaissent nettement rouges.

[1]) Les préparations sont faites comme suit :
O cm³ 5 de l'émulsion bacillaire alcaline est neutralisé exactement avec une petite quantité d'eau acidulée par HCl, puis amené par addition d'eau au volume de 3 cm³ auxquels on ajoute 1 goutte de glycérine albumineuse. On prélève et fixe sur lame des gouttes de ce mélange.

Ainsi après l'action de l'acide sulfurique, les bacilles se laissent pénétrer plus facilement par le colorant mais ils l'abandonnent de même.

(L'action de l'acide sulfurique au ½ sur les propriétés de coloration des bacilles est plus lente : la perte de leurs acido et alcoolo-résistances ne s'observe guère qu'après un contact préalable de ½ heure ; certains bacilles exigent même 1 heure).

Action de la Solution sulfo-chromique.[1]) — L'acido et l'alcoolo-résistances se trouvent déjà atténuées après 5 minutes de séjour dans cette solution et ont disparu après 10 minutes. D'ailleurs après ce temps de contact les bacilles, au sortir du liquide de Ziehl et avant l'action de tout décolorant, sont faiblement colorés et peu distincts. Le passage dans le Bleu de Kuhne les teinte en bleu comme précédemment.

(Pour avoir chaque fois une préparation témoin qui permît l'examen comparatif, la moitié seulement du frottis était plongée dans l'acide sulfurique ou la solution chromique, et l'autre moitié, demeurée inattaquée, subissait ultérieurement les mêmes temps de lavage, de coloration et de décoloration).

Ces résultats sont communs aux bacilles développés sur milieu glycériné et sur milieu glucosé.

3.

CAUSES DE L'ACIDO-RÉSISTANCE ET DE L'ALCOOLO-RÉSISTANCE.

Bien des hypothèses ont été émises sur la cause de l'acido-résistance du bacille tuberculeux.

Tandis que Klebs et Koch attribuent cette propriété aux seules substances grasses du bacille, Gasis conclut au contraire qu'elle est due aux seules matières albuminoïdes (surtout nucléiniques) car, dit-il, les bacilles après traitement par la soude à chaud, qui saponifie les graisses, sont encore

[1]) Solution obtenue avec : Bichromate de potassium . . 80 gr.
Eau . . . . . 500 »
Ac. sulfurique . . . . . 500 »
ce qui donne une solution sulfurique d'anhydride chromique. Cette solution désagrège et détruit plus rapidement et plus complètement la substance bacillaire que l'ac. sulfurique concentré.

acido-résistants. Ni les matières grasses ni les matières protéiques n'en sont cause déclare Grimme qui la rapporte à une substance particulière contenue dans le protoplasme et qu'il ne définit pas, sinon qu'elle n'est ni lipoïdique car l'acide chlorhydrique la dissout, ni albuminoïde car les ferments protéolytiques ne la décomposent point. C'est de même une substance spéciale à fonction alcool, provenant de la saponification de la matière grasse, que Bulloch et Mac Leod ainsi que Dorset et Emery puis Fontès indiquent comme jouissant spécialement sinon exclusivement des propriétés acido-résistantes. Cet alcool serait le mykol de Tamura, considéré aussi par le savant japonais comme l'élément principal de l'acido-résistance. Du reste Bulloch et Mac Leod ajoutent que les bacilles dégraissés (par l'alcool méthylique et le mélange d'Aronson, cf. p. 95) demeurent acido-résistants.

D'autres explications ont encore été présentées :

Hammerschlag fait intervenir un complexe albumino-cellulosique inclus dans le bacille et qui déterminerait l'acido-résistance ; Helbing attribue cette propriété à la présence de chitine, protéide qu'il n'a du reste nullement caractérisée, mais qu'il suppose exister du fait que les œufs de ténia dont l'enveloppe est chitineuse ont les mêmes propriétés de coloration que les bacilles tuberculeux ; Ruppel, qui constata la persistance de l'acido-résistance sur le résidu des bacilles traités par les divers solvants des graisses et les alcalis, partage l'hypothèse d'Helbing, d'autant que la chitine est trouvée chez les champignons.

A priori, et rationnellement d'ailleurs, cette propriété parait imputable à la qualité et surtout à la quantité extraordinaire de matières grasses que renferme le bacille tuberculeux.

De fait, si l'on imprègne des bandes de papier filtre avec des acides gras (ac. oléique, caprylique, — arachique, caprique, cérotique, laurique, myristique, palmitique, stéarique, ... ces derniers dissous dans un peu de chloroforme) et qu'on les soumette ensuite à l'action de la fuschine phéniquée puis de l'acide sulfurique au $^1/_4$, les parties imprégnées se montrent nettement acido-résistantes.

Les graisses neutres (huile d'olive, d'arachide, de lin, axonge, stéarine) ne possèdent pas ou possèdent peu une telle propriété et elles ne l'acquièrent que par le rancissement, c'est-à-dire par l'apparition des acides gras. C'est d'ailleurs ce que les travaux de Jacobson, de Ciaccio, de Camus et Pagniez, avaient déjà mis en évidence.

D'après les recherches de Bulloch et Mac Leod, de Dorset et Emery, la cholestérine serait également acido-résistante, — résultat que n'auraient pas obtenu Bezançon et Philibert en colorant par la méthode de Ziehl des fils de coton imprégnés de cholestérine dissoute dans de l'alcool bouillant. Mais opérant comme précédemment avec une bande de papier filtre sur laquelle j'avais déposé des gouttes d'une solution chloroformique saturée de cholestérine, j'ai constaté qu'elle présentait réellement un certain degré d'acido-résistance ; il en est de même avec la lécithine. Les cires possèdent cette propriété à un haut degré.

Si l'on soumet à la même épreuve les différentes matières grasses extraites du bacille tuberculeux dans l'appareil de Soxhlet au moyen de l'alcool, de l'éther ou du chloroforme, elles se montrent toutes acido-résistantes. Ainsi, dans mes expériences, leur coloration (faite à froid par immersion pendant 1 heure dans le liquide de Ziehl) a résisté à l'acide sulfurique au $^1/_4$ agissant $\frac{1}{2}$ minute et même 1 minute. Toutefois l'extrait alcoolique se montre moins résistant que l'extrait chloroformique qui l'est lui-même moins que l'extrait éthéré.

Pour Koch, Bienstock, Ehrlich, la substance grasse constituait l'enveloppe du bacille et Ehrlich pensait que cette gaine graisseuse ne pouvait être traversée que très lentement et très difficilement par les acides et n'était rendue perméable aux matières colorantes que par l'addition d'un mordant. Mais Ziehl montra le mal-fondé de cette conception, et la parfaite pénétration des bacilles par l'acide azotique. Pour d'autres bactériologistes, la substance grasse serait non pas limitée à l'enveloppe, mais contenue dans le protoplasma même du microbe. Cette dernière hypothèse parait plus exacte.

Vallée, Babès et Cantacuzène, Delille, Goris, déclarent que les bacilles complètement dégraissés ne sont plus acido-résistants. Bien antérieurement Borrel et Roux avaient

reconnu que les bacilles traités à l'ébullition par une solution faible d'acide chlorhydrique (qui facilite la séparation des graisses) puis épuisés à chaud par le xylol perdaient complétement leur propriété acido-résistante. — Par contre Behring, Ciaccio, Camus et Pagniez, Besançon et Philibert, Auclair et Paris prétendent que les bacilles dégraissés résistent encore à la décoloration par les acides. Il se peut que les corps bacillaires sur lesquels ces auteurs opéraient ne fûssent pas complètement débarrassés de leurs matières grasses. Mais, à la vérité, quand on fait l'hydrolyse totale des bacilles selon la méthode de Kumagawa et Suto, et que toutes les substances grasses ont été enlevées par l'éther éthylique et l'éther de pétrole, le résidu protéique montre lui aussi en certain degré d'acido-résistance : encore rose pourpre après 1 minute d'immersion dans l'acide sulfurique au $^1/_4$, il apparait en violet pâle après une recoloration de 1 minute par le bleu de méthylène. Des préparations faites avec la caséine du lait et traitées de même donnent des résultats tout-à-fait analogues.

D'autre part la double résistance (à la coloration puis à la décoloration) du bacille apparait comme liée autant à sa constitution physique qu'à sa composition chimique. Si l'on traite en effet par la méthode de coloration de Ziehl des préparations de bacilles longuement broyés dans un broyeur rotatif à billes (broyeur Borrel) on ne constate aucune acido-résistance et l'on n'obtient que des préparations bleu-pâle après la double coloration ; seuls quelques rares bacilles échappés au broyage et demeurés intacts sont colorés en rouge. Auclair et Paris, H. C. Benians et Hope Scherman font intervenir de même l'état de condensation physique des composants du bacille. Cette conception est justifiée d'ailleurs par le fait que les bacilles tuberculeux développés sur milieu glucosé et, partant, beaucoup moins riches en graisses, présentent néanmoins la même difficulté de coloration et la même résistance aux acides et à l'alcool que les bacilles développés sur milieu glycériné. (Nous verrons qu'ils présentent en outre la même résistance aux rayons ultra-violets).

Au surplus, comme le font très justement remarquer Besançon et Philibert, l'état de condensation particulier des différents éléments qui entrent dans la composition du ba-

cille trouve une preuve encore dans le fait que les réactifs spécifiques des graisses, Sudan III, acide osmique, demeurent à peu près sans action sur le bacille tuberculeux.

Une autre façon — synthétique en quelque sorte — d'étudier l'acido-résistance, c'est d'examiner dans quelles conditions des bacilles non acido-résistants par nature le deviennent cependant accidentellement ou expérimentalement. Or la plupart des bacilles accidentellement acido-résistants ont été rencontrés dans des milieux gras (smegma, cérumen, matière sébacée, beurre) et c'est en se développant dans de tels milieux qu'ils semblent acquérir cette propriété. — D'ailleurs le contrôle expérimental mit en évidence le rôle ainsi joué par les graisses, et Bienstock, Gottstein, Bezançon et Philibert purent rendre acido-résistants divers microbes (bacillus subtilis, coli-bacille, bactérie charbonneuse, bacille diphtérique et certains bacilles du foin) en les cultivant dans des milieux additionnés de beurre ou de lanoline.

Bien plus, en ensemençant simultanément sur les milieux habituels, sans addition de matières grasses, des bacilles quelconques et des bacilles tuberculeux, Gibier a pu conférer aux premiers un certain degré d'acido-résistance qu'ils ne sauraient acquérir par ailleurs, « comme si le bacille tuberculeux qui fabrique pour lui-même et de lui-même aux dépens du milieu les substances qui lui donnent sa propriété acido-résistante, en cédait un peu au bacille commensal qui végète à côté de lui ». — Un semblable résultat a été obtenu par Bezançon et Philibert en cultivant le bacillus subtilis et le bacille de charbon sur une macération de bacilles tuberculeux dans de l'eau stérilisée. Ayant examiné à maintes reprises les moisissures qui se développent parfois sur les vieilles cultures de bac. tuberculeux abandonnées dans le laboratoire, j'ai reconnu de même qu'elles se montraient plus ou moins acido-résistantes.

Notons toutefois que généralement cette acido-résistance accidentelle, d'emprunt en quelque sorte, n'est pas accompagnée de l'alcoolo-résistance.

La réaction du milieu n'a pas d'influence : s'il est vrai, comme l'ont déclaré W. Frei et N. Pokschischewsky, qu'en cultivant certains bacilles acido-résistants sur des milieux

acides on arrive à les dépouiller de leur acido-résistance, puis qu'il suffit de les cultiver pendant quelque temps sur milieu alcalin pour leur redonner de nouveau cette propriété, le bacille tuberculeux, en tout cas, qu'il se soit développé sur milieu artificiel acide ou qu'il provienne d'un milieu alcalin, m'a toujours paru posséder au même degré ses propriétés de coloration.

4.

ACTION DES RADIATIONS ULTRA-VIOLETTES.

C'est à ses rayons ultra-violets, agents puissants d'oxydation, que la lumière solaire doit ses propriétés bactéricides. L'étude de l'action de la lumière sur les Bactéries a été faite pour la première fois dans le remarquable mémoire de Downes et Blunt datant de 1877. Les différents facteurs dont dépend cette action y sont si nettement indiqués que tous les travaux publiés depuis par Duclaux, Roux, Arloing, Strauss, Buchner, Frankland et Marshall-Ward n'ont pu que préciser leur influence sans rien ajouter d'essentiel. Ces divers auteurs ont constaté : que la partie chimique du spectre est la seule active ; qu'il y a simplement retard du développement des colonies si l'insolation à été courte, empêchement total si l'insolation à été longue ; que la lumière diffuse est très peu active et que même, si les conditions de milieu sont favorables, la culture pouvait se faire à la lumière diffuse aussi bien que dans l'obscurité ; qu'il y a évidemment pour les diverses espèces microbiennes des différences de résistance individuelle ; que la virulence va en décroissant à mesure que le bacille se rapproche de la durée d'exposition mortelle ; qu'enfin dans cette action du soleil entre le processus d'oxydation qu'il détermine, car si, contrairement à l'opinion première, la présence de l'air ne semble pas nécessaire pour que la lumière détruise les microbes, du moins leur résistance est beaucoup plus grande dans le vide. Ainsi Roux (1887) a montré que des spores de bactérie charbonneuse insolées à l'abri de l'air donnaient encore une belle culture après 83 heures d'insolation, alors qu'exposées à l'air dans les mêmes conditions elles périssaient en moins de 30 heures. Duclaux et Roux (1887) con-

statèrent également que ces spores charbonneuses ne se développaient plus dans un bouillon de culture qui avait été exposé en plein soleil 3 ou 4 heures : ils émirent alors l'hypothèse que sous l'action du soleil et de l'air il se produisait dans les milieux nutritifs un changement chimique nuisible au développement des germes (changement de réaction des liquides, oxydation des corps gras). Quelques années plus tard Richardson (1893), puis Dieudonné et Marshall-Ward (1894) signalèrent la formation d'eau oxygénée dans les liquides de culture exposés au soleil et attribuèrent à l'apparition de cet agent antiseptique un rôle prépondérant dans l'action stérilisante de la lumière sur l'eau. Mais cette hypothèse est exagérée.

En ce qui concerne l'effet de la lumière sur le bacille tuberculeux, des expériences m'ont montré que des bacilles provenant de culture pure, étendus en couche aussi mince que possible sur une plaque de verre, perdent leur virulence sous l'action directe des rayons solaires dans un espace de 3 à 5 heures, par décroissance graduelle (le pouvoir bactéricide de la lumière diffuse est environ moitié moindre) ; que l'action bactéricide des rayons solaires est plus énergique en été qu'en hiver ; que d'autre part l'action de la chaleur qui se superpose à celle de la lumière ne peut être invoquée car une culture soumise dans une étuve à une chaleur séche de 65 à 70° demeure encore virulente au bout de 80 heures. Mes résultats furent confirmés à Davos par Treskinskaja (1910) qui établit en outre que l'action bactéricide des rayons solaires croit avec la hauteur du lieu.

Mais ces propriétés de la lumière solaire dues aux rayons de petite longueur d'onde ne peuvent être comparées à celles des rayons ultra-violets produits par la lampe en quartz à vapeur de mercure. La limite de l'ultra-violet solaire est en effet λ 2950 A. [1]), car tous les rayons de longueur d'onde inférieure

[1]) Les longueurs d'onde (λ) étant habituellement comptées en unités Angström (unités A. = 1 dix-millionième de millimètre), le spectre visible se trouve ainsi limité à ses extrémités aux longueurs d'onde de 8000 A. environ pour le rouge et de 4000 A. pour le violet. Le verre laisse passer les radiations d'une longueur d'onde supérieure à 3600 A. ; le quartz est transparent jusque vers 1700 A. ; la fluorine permet d'aller jusqu'à 1250 A. Si l'on emploie la lampe en quartz à vapeur de mercure, le spectre ultra-violet de cette vapeur métallique allant de 3650 A. jusqu'à 2225 A., le quartz le transmet en totalité.

à 2950 A. sont absorbés par l'atmosphère et ne nous arrivent pas. Or les rayons ultra-violets sont surtout bactéricides au-dessous de 2800 A., comme l'ont établi les recherches de Bang, élève de Finsen, et plus récemment celles de Raybaud qui au moyen de prismes et de lentilles en quartz, avait amené les rayons d'une lampe à vapeur de mercure à former un spectre assez étalé et couvrant totalement des plaques de gélatine ensemencées avec diverses moisissures et bactéries.

Les travaux de D. Berthelot et H. Gaudechon ont mis en évidence l'activité chimique intense des rayons ultra-violets dont l'action serait comparable comme généralité à celle de la chaleur ou de l'électricité.

Sur les matières complexes qui entrent dans la composition des êtres vivants, cette action est particulièrement nocive et d'une façon générale les petites longueurs d'onde sont destructives de la matière vivante.

Les expériences de Mlle Cernovodeanu et V. Henri faites sur des émulsions microbiennes ont montré que la sensibilité des divers microbes aux rayons ultra-violets n'est pas identique. Opérant dans les mêmes conditions avec une lampe Westinghouse-Cooper-Hewitt de 110 volts, ils classent ainsi par ordre de sensibilté décroissante les microorganismes dont ils se sont servis : staphylocoque, vibrion cholérique, coli-bacille, bacille typhique, pneumobacille de Friedlander, bactérie charbonneuse, bacille tétanique, bacille phléole, bacille subtilis, sarcine orange ; une émulsion des premiers étant stérilisée en 6 fois moins de temps qu'une émulsion semblable des derniers. Avec une lampe d'un voltage double et le même ampérage, toutes choses égales d'ailleurs, ces auteurs ont remarqué que la durée d'exposition pour obtenir la stérilisation était diminuée d'environ 5 fois.

Mes recherches ont été faites avec une lampe recevant un courant de 110 volts et conservant d'une façon à peu près fixe, pendant sa marche, une différence de potentiel de 23—24 volts entre ses électrodes, avec une intensité de 5,6—5,8 ampères ; sa colonne lumineuse mesurait 13 centimètres et, pour éviter son échauffement, elle était partiellement immergée dans l'eau. L'enveloppe d'une lampe fonctionnant à l'air s'échauffe en effet de 700° à 800°, la température de l'arc même

étant évaluée à 2000° environ. Or, d'après Bordier, le quartz à ces températures s'opacifierait progressivement pour les rayons ultra-violets par suite de sa transformation en silicate de mercure qui laisserait passer une quantité de rayonnement de plus en plus réduite. A l'aide de son chromo-actinomètre, il a ainsi reconnu qu'au bout de 500 heures environ de fonctionnement à l'air une lampe (de Kromayer) émettait sept fois moins de rayons. Il est vrai que V. Henri déclare n'avoir constaté aucun changement dans le rendement ultra-violet d'une lampe (Westinghouse-Cooper-Hewitt) brûlant à l'air après deux ans de service.

On a objecté à l'immersion qu'une lampe refroidie avait, à intensité de courant égale, un moindre rendement en rayons ultra-violets. Et en effet j'ai constaté qu'une lampe qui marche p. ex. avec une différence de potentiel de 26 volts pour une intensité de 3 amp. quand sa colonne lumineuse fonctionne à l'air libre, les électrodes seules étant refroidies, n'a plus pour la même intensité de courant qu'un voltage de 20 volts, partant un rayonnement ultra-violet bien moindre, lorsque sa colonne lumineuse est immergée de 2 à 3 millimètres. Mais du moins la lampe ainsi refroidie ne s'altère-t-elle pas, — et d'ailleurs, dans les limites d'un faible régime électrique, on peut obtenir avec une lampe refroidie autant de rayons ultra-violets qu'avec une lampe chaude si l'on consomme davantage de courant : ainsi, dans l'exemple précédent, 26 volts seront donnés avec 8 ampères, par la lampe partiellement immergée.

De plus la chaleur dégagée, aux régimes élevés, par la colonne lumineuse fonctionnant à l'air libre peut être nuisible à certaines expériences et obliger, pour éviter son action, à opérer à une plus grande distance de la lampe : dans ce cas le gain en rayonnement se trouve considérablement réduit. Par exemple, d'après mes mesures, le rendement ultra-violet d'une lampe brûlant à 35 volts (lampe fonctionnant à l'air libre) est environ deux fois et demie plus fort que celui d'une lampe brûlant à 23 volts (lampe refroidie) ; mais à 3 centim. de la lampe on a une température atteignant vite 80° dans le premier cas, tandis qu'elle n'est que de 25 à 30° dans le second au bout du même temps de marche. Et alors si, pour éviter l'action calorifique, on se place à 6 centimètres de la lampe marchant

à 35 volts, l'intensité ultra-violette à cette distance sera sensiblement quatre fois moindre qu'à 3 centimètres : par conséquent on a tout intérêt à employer un faible régime électrique avec une lampe refroidie qui permettra d'opérer à peu de distance de la colonne lumineuse.

C'est avec une lampe fonctionnant dans ces conditions que j'ai fait des essais de stérilisation sur le bacille tuberculeux.

J'ai utilisé comme contenants du liquide bacillifère soit un tube tournant horizontalement autour de son axe grâce à un mouvement d'horlogerie (dispositif indiqué par A. Borrel) et dont le bouchon était muni d'un serpentin pour parfaire le brassage, — soit une cuve rectangulaire fixe, tous deux en quartz et placés à 2 centimètres seulement au-dessus de la lampe. Pour réduire encore le rayonnement calorifique, j'ai interposé entre la cuve fixe et la lampe une plaque de quartz de 4 millimètres d'épaisseur : en opérant ainsi, avec un régime électrique constant de 5,6 — 5,8 ampères et 23 — 24 volts, la température du fond intérieur de la cuve et a fortiori la température dans le tube tournant n'atteignent pas, en aucun cas, 55° au bout de 60 minutes continues d'irradiation (elle est de 35° au bout de 15 minutes) et la stérilisation est bien due exclusivement aux petites longueurs d'onde.

Le tube (qui a 115 millimètres de long et 20 millimètres de diamètre) a servi pour les essais de stérilisation portant sur 10 et 20 cm^3 de liquide bacillifère. La cuve (qui a 70 millimètres de long et 30 millimètres de large), pour des essais portant sur de petites quantités, 1 à 5 cm^3).

Les températures dans le tube ont été données par un thermomètre à maximum mis à la place du serpentin. — Celles de la cuve ont été déterminées à l'aide de substances à point de fusion connu [1]), que j'ai fait adhérer d'une façon aussi intime que possible sur le fond de la cuve, ou placées sur la nappe d'eau constamment agitée que cette cuve contenait.

A. — **Essais de stérilisation dans la cuve.** — (La quantité irradiée est chaque fois inoculée en totalité à un cobaye).

a) Des écailles de bacilles frais (cultures de 1 mois sur pomme de terre) délayées avec quelques gouttes d'eau glycérinée à 25 % et étalées directement en couche uniforme et mince sur le fond de la cuve, puis, après irradiation, inoculées aux cobayes, se sont montrées plus ou moins mais toujours infectantes, si minime que fût la couche bacillaire (essais faits avec des quantités de bacilles variant de 10 à 100 milligrammes)

[1]) Paraffine fondant à 35°,— Salol fondant à 42°,— Paraffine fondant à 55°.

et si prolongée que fût l'irradiation (½ heure). Il demeure dans tous les cas de très gros amas impénétrables aux rayons ultra-violets. — Mode de stérilisation à rejeter.

b) — Les suspensions dans l'eau glycérinée à 25 %, riches à 30 milligrammes de bacilles frais par cm³, et obtenues en soumettant à une rotation dans un broyeur à billes de verre (broyeur Borrel) le liquide et la masse bacillaire, sont demeurées infectantes après une irradiation de 30 minutes, la quantité irradiée étant chaque fois 2 cm³. (ce qui donne dans la cuve une nappe de 1 millimètre environ d'épaisseur). Ces suspensions — on pourrait dire ces émulsions — sont opalescentes et contiennent toujours, à côté de bacilles isolés, de nombreux et parfois gros amas bacillaires même après un broyage de 1 heure (et même de 2 heures).

Avec des suspensions beaucoup moins riches, des amas subsistent encore, moins nombreux et moins compacts sans doute, mais suffisants néanmoins pour rendre inconstants les résultats de l'irradiation ; — et si l'on prolonge un peu la rotation dans le broyeur à billes (3 heures p. ex.) pour parfaire la dissociation de ces amas, on obtient alors une émulsion très laiteuse, présentant par suite un inconvénient de même ordre qui ne permet pas de fixer une limite à la durée du rayonnement nécessaire pour obtenir une stérilisation certaine. Ainsi des suspensions irradiées dans les mêmes conditions que précédemment, mais riches seulement à 20 milligrammes de bacilles frais par cm³ se sont montrées infectantes quatre fois sur dix expériences faites (infection très atténuée du reste par rapport à celle des témoins). — Il en fut de même pour une émulsion riche à 10 milligrammes de bacilles frais par cm³.

Au surplus, on ne pourrait trop prolonger le broyage qui amènerait la destruction d'une quantité notable de bacilles [1]). D'ailleurs l'émulsion n'en deviendrait que plus opaque, et les rayons utra-violets ne traversent que des milieux parfaitement transparents.

Pour la même raison les toxines microbiennes ne peuvent, elles aussi, être détruites que difficilement par les rayons ultra-violets : ou bien il faut faire une solution suffisamment diluée

[1]) Pour avoir une destruction complète des bacilles par broyage (dans les conditions indiquées ci-dessus) il faut 7 à 8 heures.

de la toxine dans l'eau, à 1 /2000e p. ex., pour obtenir sa destruction en quelques minutes (expériences de Courmont et Nogier, puis de Melle Cernovodeanu et V. Henri avec la toxine tétanique ; expériences de Baroni et Jonesco-Mohaiesti avec la toxine diphtérique et la toxine ricinique) ; — ou bien il faut les exposer en couche excessivement mince [1]). Pour détruire l'activité toxique que possède la tuberculine de Koch vis-à-vis des cobayes tuberculeux, la durée d'exposition doit être très longue: 1 heure 1/4 à 1 heure ½ sous une épaisseur de 2 millimètres, à 2 centimètres au-dessus de la lampe marchant au régime de 23 volts ; cette destruction est beaucoup plus lente dans le vide que dans l'air. Il est vrai que la tuberculine de Koch, constituée par un liquide glycériné au ½, est assez opaque [2]).

B. — **Essais de stérilisation dans le tube tournant.** — (La quantité irradiée est chaque fois inoculée en totalité à plusieurs cobayes).

Ces essais ont donné des résultats semblables à ceux obtenus avec la cuve.

a) — 10 cm³ d'une suspension riche à 20 milligr. de bacilles frais par cm³ ont été partiellement infectants même après une irradiation de 30 minutes.

---

[1]) Il en est de même pour les diastases dont l'action se trouve atténuée ou même détruite par les rayons ultra-violets après un temps d'irradiation variant avec la concentration des solutions. D'ailleurs, comme les bacilles eux-mêmes, elles présentent des sensibilités différentes : ainsi Agulhon a reconnu que la sucrase et l'amylase du malt sont très rapidement atténuées par les radiations ultra-violettes ; que l'amylase pancréatique et la pepsine sont beaucoup plus résistantes ; que l'émulsine et la présure sont moyennement résistantes.

Hertel avait rapporté l'atténuation des enzymes par les rayons U.-V. à un phénomène de réduction ; mais d'après le mémoire d'Agulhon il ne semble pas possible de donner une unique explication du mécanisme de l'action de l'ultra-violet sur les diastases : la catalase de panne de porc et l'émulsine p. ex. sont, toutes choses égales d'ailleurs, moins activement détruites dans le vide qu'en présence d'oxygène, tandis que la présure est attaquée d'une façon aussi intense en présence de l'oxygène que dans le vide.

[2]) On peut aisément se rendre compte de l'opacité relative des différents liquides soumis au rayonnement ultra-violet à l'aide d'un papier au citrate d'argent placé au-dessus des liquides irradiés pendant un temps suffisant pour obtenir un noircissement toujours égal, les conditions d'expérience demeurant toujours les mêmes.

Essais faits avec la cuve placée à 2 centimètres au-dessus de la lampe et contenant 5 c. c. de liquide, soit une nappe de 2 millimètres environ

b) — Même incertitude avec une suspension riche seulement à 10 milligr. de bacilles frais par cm³ et irradiés 15 minutes et même 30 minutes.

De ces essais il ressort que le brassage du liquide se fait plus ou moins bien et que la stérilisation n'est pas uniforme, surtout lorsque la durée d'irradiation est faible ; aussi les résultats ne sont-ils pas constants.

c) — Il faut descendre à une teneur bacillaire très faible pour être toujours certain du résultat : p. ex. 15 cm³ d'une émulsion à 0 milligramme 25 seulement de bacilles frais par cm³, après une irradiation de 10 minutes, ont montré une stérilisation totale.

Ainsi donc les émulsions microbiennes à cause de leur opacité et des amas qu'elles contiennent toujours sont difficilement stérilisables, ou alors il faudrait un temps d'irradiation très long.

Des recherches rigoureuses ne peuvent être faites que sur des suspensions de bacilles isolés. De telles suspensions, parfaitement limpides, obtenues par filtration sur papier, après rapide dissociation de la masse bacillaire dans un broyeur à

---

d'épaisseur, le régime électrique demeurant constant (5,6—5,8 amp. 23—24 volts) :

Liquide irradié	Durée d'exposition du papier	Coefficient d'opacité
Eau distillée	30 secondes	1 (Noircissement étalon choisi)
– glycérinée 6 %	45 –	1,5
– – 25 %	60 –	2
– – 50 %	80 –	2 66
Bouillon de viande . . . . . (peptoné-glycériné, limpide)	100 –	3,3
Tuberculine brute de Koch	210-220 –	7

30 secondes d'exposition du papier avec la cuve vide donnent un noircissement égal à celui obtenu pendant le même temps lorsque la cuve renferme 5 c. c. d'eau distillée. — On voit que l'eau glycérinée employée dans le but de rendre la suspension bacillaire plus stable absorbe notablement les rayons U. V.

billes, et contenant 1000, 3000 et 5000 bacilles par millimètre-cube [1]), sans aucun amas, ont été irradiées soit dans la cuve sous une faible épaisseur (1 millimètre environ), soit dans le tube tournant (10 cm^3), dans les mêmes conditions expérimentales.

Dans l'un et l'autre cas, même avec des suspensions de 5000 bacilles par millimètre-cube, la stérilisation a toujours été complète au bout de 8 minutes d'irradiation pour les essais faits dans la cuve, — au bout de 10 minutes pour les essais faits dans le tube tournant, et ce sont là des limites maxima. Dans l'un et l'autre cas en effet les cobayes inoculés avec les bacilles irradiés, et tués deux mois après l'inoculation, n'ont présenté aucune lésion.

J'ai mentionné que tous les essais précédents ont porté sur des cultures âgées de 1 mois. — Avec des cultures jeunes, âgées seulement de 8 jours, la durée d'irradiation nécessaire pour leur stérilisation, toutes choses égales d'ailleurs, est réduite de $^1/_3$ à $^1/_2$ environ. Cette plus grande sensibilité des bacilles jeunes est du reste générale : ainsi, d'après Bang, dans les mêmes conditions d'irradiation une culture de *Micrococcus prodigiosus* de 3 à 4 heures est tuée en 40 à 80 secondes ; une culture de 6 à 7 heures est tuée en 100 à 120 secondes ; une culture de 12 heures et plus, en 300 secondes. Les spores des *Bac. anthracis* et *subtilis* sont, d'après H. Jansen, 3 à 5 fois plus résistantes que les bacilles eux-mêmes.

Les expériences de stérilisation que je viens de relater furent faites avec des bacilles cultivés sur milieu glycériné. Répétées dans de semblables conditions avec des bacilles de même origine mais développés sur milieu glucosé, elles m'ont

[1]) Ces suspensions furent faites dans de l'eau salée à 7 gr., 50 ‰ ; pour l'examen microscopique et la numération, une partie est prélevée et diluée d'une quantité convenable d'eau légèrement albumineuse (II gouttes de glycérine-ovalbumine à P. E. pour 1 c. c. de liquide), le mélange étant fait par agitation dans un flacon avec quelques billes de verre. Des gouttes de 1 millimètre-cube de ce mélange, mesurées très exactement au moyen d'une burette de précision, sont fixées sur lame et colorées avec le liquide de Ziehl. Il importe que la dessication et la fixation soient faites rapidement à haute température pour éviter, au pourtour de la goutte, une zone plus épaisse qui rendrait la numération difficile.

donné les mêmes résultats. Leur moindre teneur en corps gras ne rend pas ces bacilles plus sensibles à l'action stérilisante des radiations ultra-violettes.

Dans toutes mes expériences, la stérilisation est bien due aux rayons ultra-violets et non pas à l'ozone ni à l'eau oxygénée. J'ai cherché à constater la présence de l'eau oxygénée au moyen des réactions colorées très sensibles de l'anhydride chromique ou du bichromate-aniline de A. Bach et mes résultats ont été négatifs [1]). La stérilisation est d'ailleurs réalisée aussi bien dans des tubes de quartz complètement vides d'air ou remplis de gaz inerte (H., Az.).

D'autre part l'irradiation préalable, pendant plusieurs heures, de l'eau ou d'un milieu nutritif n'a aucune influence sur les microorganismes que l'on introduit ensuite dans cette eau ou dans ce milieu et qui s'y développent parfaitement.

La résistance particulière que présente le bacille tuberculeux au « pouvoir abiotique », selon l'expression de Dastre, des petites longueurs d'onde apparait aussi dans les phénomènes de coloration.

D'une façon générale, sous l'action des rayons ultra-violets, les bactéries subissent des modifications dans leur manière d'être vis-à-vis des colorants, conséquence d'une modification de leur substance même : ainsi certaines spores peuvent être teintées sans mordants ; certaines bactéries perdent la réaction de Gram (bac. du charbon, staphylocoque, streptocoque, bac. subtilis, bac. tétanique). Si l'action des rayons est prolongée, le corps microbien apparait alors comme désagrégé : on peut même obtenir une véritable bactériolyse.

En ce qui concerne le bacille tuberculeux, le soumettant à des durées croissantes d'irradiation (lampe fonctionnant

[1]) V. Henri a trouvé que de l'eau placée à une distance de 20 centimètres d'une lampe W. C. H. de 220 volts marchant au régime de 95 volts et 4,2 ampères ne titre après 30 minutes d'exposition que $^1/_5{}^e$ de milligramme d'H^2O^2 pure par litre. Or, d'après les expériences faites par Courmont, Nogier et Rochaix sur une eau contenant 1800 000 colibacilles par litre, il faut ajouter à cette eau pour la stériliser 80 c. c. d'eau oxygénée à 10 volumes, soit 1 gr., 214 d'H^2O^2 pure par litre, et maintenir le contact pendant 3 heures.

comme précédemment au régime de 23—24 volts sous 5,6—5,8 ampères), soit à l'état sec, soit en milieu liquide, j'ai constaté que son acido-résistance se montrait elle aussi assez tenace, qu'il s'agisse, ici encore, de bacilles dévéloppés sur milieu glycériné ou sur milieu glucosé [1]).

a) à l'état sec. — Des lames porte-objet portaient 2 gouttes desséchées (mais non fixées) d'une même émulsion bacillaire (émulsion contenant 3 milligrammes de bacilles humains pesés à l'état sec, par cm^3) ; l'une d'elles (goutte témoin) était recouverte par une feuille de clinquant ou par une épaisse lame de verre empêchant l'action des rayons U.-V., tout en conservant l'action de la chaleur. Ces lames étaient placées à 2 centimètres au dessus de la lampe.

Au bout de 1 heure d'irradiation, les bacilles exposés au rayonnement étaient encore aussi acido-résistants que ceux de la goutte témoin. Il fallait une irradiation de 3 heures pour que l'acido-résistance disparût. — D'ailleurs au bout de ce laps de temps, les bacilles se présentaient avec une forme granuleuse, souvent même avec des solutions de continuité qui leur donnaient l'aspect de cocci disposés en chapelet et conservant la forme du bacille mais dont chaque granule était séparé du suivant par une vacuole.

b) en milieu liquide. — 15 cm^3 de la même émulsion bacillaire étaient mis dans le tube tournant à 2 centimètres ½ de la lampe. Au bout de 3 heures continues d'irradiation, les bacilles présentaient la même acido-résistance que ceux de l'émulsion non irradiée.

Dans l'un et l'autre essai, les bacilles ont été examinés et comptés dans des champs repérés, d'abord avant l'action de l'acide sulfurique au $^1/_4$, puis après 1 minute de séjour dans cet acide.

Les bacilles du smegma, dans les mêmes conditions expérimentales, avaient déjà perdu leur acido-résistance au bout de 30 minutes.

---

[1]) Les préparations étaient soumises aux conditions limites de coloration et de décoloration établies précédemment : 2 heures à froid dans la solution phéniquée de fuschine, et 1 minute dans l'ac. sulfurique au $^1/_4$.

Comme conclusion générale de ce chapitre, il ressort que la *quantité* de matières grasses ne semble pas être chez le bacille tuberculeux la déterminante exclusive de sa résistance spéciale à l'extraction alcoolique, à la pénétration des colorants et à la décoloration par les acides, à l'action destructive des rayons ultra-violets. C'est la *qualité* surtout de ses constituants (l'insaponifiable en particulier, dont le taux est toujours très élevé) qui intervient, — et même quand il se rapproche au point de vue quantitatif, par culture sur milieu glucosé, de la plupart des microbes pathogènes, le bacille tuberculeux n'en conserve pas moins ses propriétés particulières. Or nous avons vu précisement que la nature des matières grasses, quel que soit l'aliment ternaire producteur, glycérine ou glucose, ne parait pas modifiée.

CHAPITRE V.

INFLUENCE DU MILIEU SUR LA MORPHOLOGIE ET LA VIRULENCE DU BACILLE TUBERCULEUX

De nombreuses observations ont établi que chez le bacille tuberculeux, à côté de l'aspect classique, des formes anormales se présentent parfois tout-à-coup. METCHNIKOFF, puis NOCARD et ROUX (1888), ont, les premiers, décrit de véritables formes géantes rencontrées dans les vieilles cultures : formes allongées, ramifiées, souvent renflées en massue et sur lesquelles on trouve quelquefois des bourgeons latéraux épaissis, insérés à angle droit.

Tout d'abord ces modifications morphologiques ont paru l'apanage du bacille de la tuberculose aviaire vieillissant dans ses cultures ou végétant à température élevée. Mais bientôt des formes analogues furent observées chez les bacilles des mammifères. BABÈS (1888), CZAPLEWSKI (1891), COPPEN JONES (1895) les ont signalées dans les expectorations où j'en ai rencontré également.

En faisant des cultures à des températures dysgénésiques, à 43°,6 par exemple, METCHNIKOFF a vu de telles formes se multiplier. Il les considère comme des déviations « involutives » du type normal.

Avec les milieux nutritifs usuels, ces formes aberrantes sont rares, et sans doute apparaissent-elles à la suite d'une anomalie qui nous échappe. Au demeurant, les expériences de GUIGNARD et CHARRIN, puis celles de COSTANTIN, BONNIER, DASSONVILLE, MOLLIARD, MATRUCHOT, LESAGE, BLARINGHEM, etc..., sur le transformisme expérimental montrent l'extrême plasticité non seulement des microbes mais des végétaux même supérieurs, et en particulier les changements morphologiques

qu'ils peuvent subir sous le déterminisme du milieu. Toutefois ce sont les microorganismes surtout qui témoignent de cette merveilleuse élasticité fonctionnelle et réactionnelle de la cellule, embrassant non pas seulement sa morphologie mais aussi sa biologie : il y a tout un genre de la famille des Bactériacées, chez lequel ces variations sont en quelque sorte normales et que HAUSER a dénommé *Proteus* à cause du pléomorphisme qu'il présente, — encore que l'impureté des cultures n'y soit peut-être pas tout-à-fait étrangère ; — le bacille pyocyanique qui, cultivé dans du bouillon peptoné ordinaire, sécrète deux pigments, l'un de couleur bleue, l'autre de couleur verte, ne donne plus dans la peptone que du pigment bleu, et dans l'ovalbumine que du pigment vert fluorescent (GESSARD, 1891) ; — la bactéridie charbonneuse sous l'action d'une petite quantité de bichromate de potassium ou d'acide phénique perd sa fonction physiologique de former des spores (CHAMBERLAND et ROUX, 1883) ; etc... — NÆGELI prétendait même qu'il n'y avait pas d'espèces bactériennes, un coccus devenant selon les conditions de vie bâtonnet ou spirille et inversement ; il leur niait aussi toute spécificité biologique. Mais si COHN dogmatisait à l'excès et à tort la constance des formes, NÆGELI exagérait sans doute ces mutations sans limites.

Sur le milieu défini au glucose (page 36), les bacilles tuberculeux ont la forme classique de ceux cultivés sur les milieux à la glycérine ; ils présentent toutefois des dimensions plus petites.

Ceux qui se sont développés sur le milieu ne renfermant ni glucose ni glycérine mais seulement de l'acide citrique (page 40) apparaissent comme formés de grains alignés en chapelet, sans qu'on distingue un protoplasme intergranulaire. Il est vrai qu'on a affaire à un voile très jeune, puisque son développement sur un tel milieu a été presque nul.

Les bacilles provenant du milieu additionné, par litre, de 0 gr., 33 de manganèse ou de cuivre à l'état de sulfates sont en général courts avec fréquemment des renflements terminaux ; ceux qui sont allongés ont un aspect pluri-articulé : l'acido-résistance est moindre au niveau des étranglements et les masses terminales ne demeurent pas toujours très bien colorées par la liqueur de ZIEHL. Ces différences

sont moins sensibles chez les bacilles provenant du milieu additionné d'une même quantité de sulfate de fer. Mais ajouté dans la proportion de 4 grammes par litre ce sel commence à entraver le développement des cultures et des formes aberrantes apparaissent : certains bacilles, souvent très allongés (6 à 10 μ), portent des massues rappelant celles de l'actinomycose.

Les bacilles développés sur milieu renfermant de l'urée (page 32) ont de même, en général, un aspact granuleux, des formes tourmentées, avec des renflements terminaux se surcolorant en bleu.

Quoi qu'il en soit, ces aspects anormaux ne subsistent pas ; dus à de mauvaises conditions d'existence, ils peuvent durer tant que durent celles-ci, mais disparaissent avec elles et la morphologie du bacille, changée momentanément sous l'influence de causes déformantes ou inhibitrices, fait retour au type normal, homogène, quand les cultures sont réensemencées sur des milieux ordinaires. [1])

* * *

La nature du milieu de culture et les conditions physiques ou chimiques dans lesquelles se fait le développement n'influent pas seulement sur la forme ou les fonctions physiologiques de certaines Bactériacées. Les propriétés virulentes des espèces pathogènes peuvent elles aussi être influencées par les mêmes causes et cette modification est bien la plus intéressante sinon la plus curieuse que puissent faire naître les modes de culture.

Ainsi le bacille du rouget du porc gagne en virulence pour cet animal quand il passe par le milieu « pigeon » et a cette

[1]) Ces formes allongées, ramifiées et souvent renflées en massue que peut présenter le bacille tuberculeux ont déterminé certains auteurs à le rapprocher des microorganismes appartenant au genre *Oospora* (Walroth), et souvent désignés sous ce nom de *Streptothrix* (Cohn) et de *Nocardia* (de Toni et Trevisan) — Champignons microscopiques, abondamment répandus, ils végètent sur certaines plantes ou bien vivent en parasites sur les téguments et les muqueuses des animaux et de l'homme. Les affections qu'ils produisent auraient assez souvent les apparences d'affections tuberculeuses, et de telles analogies seraient une preuve de parenté mycologique. Sartory isola, entre autres, un *Oospora acido-résistant* à forme bacillaire. Toutefois son acido-résistance est temporaire disparaissant, au bout de 3 à 4 repiquages et, contrairement au bacille tuberculeux, il ne se développe pas sur pomme de terre glycérinée mais pousse rapidement sur liquide maltosé.

virulence au contraire diminuée quand il passe par le milieu « lapin ». Ainsi la bactéridie charbonneuse cultivée, non plus à 30—37°, mais à 42—43° perd progressivement sa virulence, — tout en conservant d'ailleurs sa propriété de sporuler lorsque les conditions de température redeviendront convenables ; et, fait remarquable, l'atténuation se trouve fixée dans la spore car celle-ci donnera des bacilles de même virulence que ceux dont elle provient (Pasteur, Chamberland et Roux, 1881).

Roux et Yersin ont reconnu que les cultures du bacille diphtérique diffèrent beaucoup de toxicité suivant la réaction du milieu, l'activité de la toxine augmentant en même temps que l'alcalinité. Ce fait corrobore l'analogie entre certaines toxines microbiennes et les diastases dont la sécrétion change de même selon la réaction du milieu.

La virulence du bacille tuberculeux, d'après les expériences de Baudran, serait fortement atténuée par culture sur milieu additionné de fer, et des cobayes ont pu recevoir sans inconvénient, en injection intrapéritonéale, 1 centigr. de bacilles développés dans ces conditions. Le manganèse essayé également par cet auteur augmenterait plutôt la toxicité du bacille.

J'ai constaté que les bacilles cultivés sur milieu renfermant de l'urée perdaient beaucoup de leur virulence.

D'après Calmette, Massol et Breton, les cultures sur milieu défini avec asparagine seraient très sensiblement moins virulentes que celles sur bouillon glycériné.

Enfin Frouin a remarqué que les bacilles développés sur milieu sans glycérine se montrent moins virulents pour le cobaye, en injection intrapéritonéale, que ceux développés sur milieu glycériné et qui sont beaucoup plus riches en corps gras. — Par contre Whise et Gammon prétendent que les bacilles cultivés sur milieu additionné de matières grasses, « et partant surnourris de graisses », perdraient également de leur virulence.

Mais alors que la faculté de sporuler ne peut être rendue à la bactéridie charbonneuse asporogène, la perte ou l'atténuation de virulence, transmissibles aussi longtemps que l'on voudra par des cultures, sont susceptibles néanmoins d'être

effacées par certaines techniques ; et quand la bactéridie charbonneuse a été privée de toute virulence pour le cobaye, le lapin et le mouton, on peut lui restituer son activité par des passages successifs dans le corps de ces animaux (Pasteur, Chamberland et Roux, 1881).

Il en est de même pour tous les microbes dont on a artificiellement atténué ou supprimé le pouvoir pathogène. Des artifices de culture avaient amoindri la virulence, des artifices de culture l'exaltent ; — et à un point de vue plus général : tel terrain convient à un microbe et au complet développement de ses propriétés, — tel autre lui est défavorable et limite son action.

Pourtant il n'y a souvent entre eux que des différences subtiles ; ainsi tel Penicillium consomme l'acide tartrique droit et laisse intact l'acide tartrique gauche ; tel Saccharomyces ne fait fermenter que les sucres dans lesquels le nombre des atomes de carbone est 3 ou un multiple de 3 ; le passage sur inuline exalte les fonctions fermentatives du bacille orthobutylique vis-à-vis du glucose, et inversement le passage sur glucose rend ce bacille plus apte à faire fermenter l'inuline. Le glucose est en quelque sorte réceptif pour le bacille tuberculeux, tandis que le galactose est réfractaire.

De même encore les expériences de Gessard sur le bacille pyocyanique ont montré que l'albumine favorise la fonction fluorescigène et que la peptone l'exclut ; c'est l'inverse au contraire pour la fonction pyocyanogène ; — et Gessard de conclure : « que l'on considère la fonction en microbie aussi bien sous le point de vue pathogène que sous le point de vue chromogène, le sens des constatations n'en sera pas affecté. On peut par un rapprochement légitime assimiler à une infection cette propagation de la couleur bleue par un contage vivant ; inégale réceptivité des milieux, virulence variable des races, tels sont les traits principaux de cette infection bleue et qui sont communs aux autres infections. »

Le corps de l'animal, comme les milieux de culture, représente en effet le terrain, et chez les divers animaux bien que les mêmes fonctions protectrices se retrouvent, il y a dans la structure et la composition de leurs cellules des différences également subtiles, encore plus délicates à préciser d'ailleurs,

et qui font que celui-ci sera réceptif et celui-là réfractaire. C'est probablement derrière la composition physico-chimique des milieux internes que se cache le mystère aussi bien de la réceptivité morbide que de l'immunité naturelle ou acquise.

Les lapins albinos ont l'immunité contre le pouvoir hémocoagulant des extraits d'organes, et même le lièvre polaire qui est sujet à l'albinisme saisonnier, ne jouit de cette immunité singulière que pendant cette période, alors qu'il en est privé quand son pelage devient gris. Les différences chimiques expliquent sans doute de même comment les Schizomycètes pathogènes ne sont susceptibles de se développer que dans certaines espèces ; comment la morve qui atteint les solipèdes, le lapin et l'homme, épargne le chien et le bœuf ; pourquoi la bactéridie charbonneuse s'attaque au mouton, au bœuf, à l'homme, tandis que le chien et le porc ne lui sont pas des terrains favorables ; pourquoi les Gallinacés sont naturellement réfractaires au tétanos et la mangouste réfractaire aux venins des serpents.

« Si l'on veut bien réfléchir, écrit G. Bertrand, d'une part aux différences de composition chimique, même qualitatives, qui peuvent exister entre deux espèces très voisines, d'autre part à l'extraordinaire variété de matières albuminoïdes qu'il est aujourd'hui possible de concevoir, il ne paraîtra pas excessif d'assimiler des espèces animales ou des variétés physiologiques d'une même espèce animale à des milieux de culture variés, ni d'expliquer l'immunité des unes et la réceptivité des autres à l'égard d'un microbe déterminé par une différence chimique ou seulement stéréochimique de leurs parties constituantes. ».

Les travaux de Bordet ont éclairé le mécanisme de l'immunité et mis en évidence *in vitro* le caractère éminemment spécifique de celle-ci. Mais jusqu'ici on n'est pas arrivé à expliquer complètement ou d'une façon probante et définitive la production des changements qui surviennent dans l'économie des animaux au cours de l'immunisation.

La théorie cellulaire de Metchnikoff, pour qui l'immunité est toujours ou presque toujours due à un acte digestif intra ou extra-cellulaire, s'appuie sur un grand nombre de faits très bien établis, mais n'explique pas tous les phénomènes.

Bien que plus générale que la théorie de Metchnikoff, mais plus hypothétique aussi, la théorie d'Ehrlich, pour qui l'immunité dépend de l'élaboration de substances neutralisant chimiquement les poisons injectés ou produits au cours des infections, ne satisfait pas entièrement. En effet si, pour chaque colloïde quel qu'il soit, — et ils sont légion, — introduit dans le milieu intérieur, celui-ci trouve et produit immédiatement l'anti-corps rigoureusement spécifique qui lui convient, c'est supposer au protoplama vivant un génie et une puissance chimiques quelque peu prodigieux, — et alors on ne comprend pas qu'il soit incapable de fabriquer l'anti-corps spécifique des alcaloïdes, substances purement chimiques et bien moins complexes que les toxines microbiennes et en général que les colloïdes. J'ai injecté en effet à des cobayes et à des lapins des doses croissantes de quinine, quassine, cocaïne, et jamais le sérum des animaux après l'injection et le retour à l'état normal n'a donné de précipité par addition de l'alcaloïde antérieurement injecté. Ainsi donc il existe une différence fondamentale entre les poisons de composition chimique connue, alcaloïdes et glucosides, et les toxines proprement dites : les toxines seules donnent chez l'animal qui en a reçu à doses ménagées des antitoxines. Il existe des antitoxines contre la ricine ; il n'y en a pas contre la solanine et l'amygdaline qui sont des glucosides, lesquels ne donnent pas d'antiglucosides. — Sans doute les images concrètes que la théorie d'Ehrlich suggère soutiennent l'esprit et peuvent faciliter l'analyse des réactions cytasiques si complexes des organismes. Elle n'en reste pas moins une hypothèse, féconde peut-être, mais dépourvue de bases scientifiques, et qu'Arthus qualifie de « roman chimico-biologique ».

A la théorie compliquée des chaînes latérales d'Ehrlich, Le Dentec qui tenta d'expliquer par la physique toute la biologie dont il voulait faire une science déductive, opposa une explication purement physique (les colloïdes étant régis par les lois de la chimie-physique et non de la chimie seule). Elle est basée sur le fait que chaque colloïde serait doué d'un rythme propre, analogue au rythme sonore ou lumineux, mais porté par un substratum au lieu de se propager librement dans l'air ou l'éther. Chez l'animal guéri du charbon, par exemple, les colloïdes de son sérum qui ont digéré le colloïde microbien en

lui imposant leur rythme, ont néanmoins conservé l'empreinte en quelques sorte du rythme du colloïde digéré, comme nous conservons le souvenir des choses perçues ou vues. Les substances chimiques, comme les alcaloïdes, n'ont pas de rythme.

D'ailleurs Bordet dès le début de ses recherches en 1896, avait lui aussi conçu les réactions d'immunité non comme des combinaisons chimiques, mais comme des phénomènes physiques d'absorption ou d'adhésion moléculaire, la virulence du microbe se façonnant et se modelant d'après la résistance de l'organisme : « l'offensive est le décalque de la défensive et lui correspond fidèlement ; c'est la raison de l'exaltation de la virulence par des passages ». — Mais quel que soit le processus de défense de l'organisme, il n'en demeure pas moins que les différentes espèces, de constitutions chimiques inégales, se montrent inégalement propices au développement et à l'action pathogène de tel ou tel microbe : le pouvoir pathogène de ceux-ci est, comme leur développement, fonction de la constitution chimique du terrain.

CONCLUSIONS.

I. — **Nutrition du Bacille.** — *a*) Pour la *nutrition minérale* du bacille tuberculeux, le phosphore, le soufre, le potassium et le magnésium sont nécessaires et suffisants (du moins dans les limites de pureté des produits employés et sans rien préjuger sur la nécessité possible d'autres minéraux existant peut-être à notre insu, à l'état de traces chimiquement indécelables). Le sodium ne peut remplacer le potassium, et pas davantage l'arsenic (non toxique pourtant à la dose de 1 gr., 50 d'arséniate de potassium par litre) ne peut être substitué au phosphore. — Le manganèse, le fer, le cuivre, introduits sous forme de sulfates dans les solutions nutritives, produisent à faibles doses (1/100 000e) une accélération du développement microbien et un accroissement de récolte qui, passant par un maximum, décroissent quand la proportion de ces métaux atteint une certaine valeur peu élevée d'ailleurs (1/6000e pour le fer et le cuivre, et 1/20 000e déjà pour le manganèse). A ce point de vue le bacille tuberculeux parait être beaucoup plus sensible à l'action du manganèse qu'il ne l'est à celle du cuivre et surtout à celle du fer ; — et, parmi ces trois métaux, c'est le fer qui semble exercer l'action la plus favorable avec la zone optima de concentration la plus étendue, celle du manganèse étant au contraire la plus restreinte.

b) Comme *aliment azoté*, les substances organiques (citrate ou tartrate ou succinate d'ammonium, mais surtout asparagine ou acide aspartique) se sont montrées de beaucoup préférables aux susbtances minérales essayées (sulfate ou azotate d'ammonium, et azotate de potassium : ces deux derniers sels peuvent même être toxiques), — et c'est l'azote du groupement carboxyle-aminé, commun à tous les acides aminés, qui parait être le mieux utilisé. L'urée en faibles proportions peut être alimentaire sans donner toutefois d'abondantes récoltes ;

elle a une action déjà retardatrice à la dose de 4 gr. par litre de liquide nutritif, et nettement empêchante à la dose de 8 grammes.

c) Contrairement aux conclusions jusqu'ici admises, la glycérine comme *aliment ternaire* n'est pas indispensable au bon développement du bacille tuberculeux et peut être remplacée par le glucose associé à l'acide citrique qui facilite l'attaque du sucre. Les alcools polyatomiques (érythrite, dulcite, mannite, sorbite), les pentoses (arabinose), les hexobioses (saccharose, lactose, maltose). les polysaccharides (amidon, inuline, dextrine) ne sont pas attaqués. Les citrates de potassium ou de sodium employés seuls sont insuffisants. — De même que dans l'utilisation des amines comme source d'azote la structure de la chaîne qui porte la fonction aminée a une influence, de même la constitution stéréochimique des sucres parait jouer un rôle important dans leur valeur alimentaire : en effet, parmi les hexoses, le galactose n'est pas attaqué par le bacille et le lévulose ne permet qu'un chétif développement.

d) Le glucose assure, dans un court espace de temps une récolte nettement plus abondante que la glycérine à équivalence d'apport de carbone ; mais le « coefficient d'utilisation » exprimant le « rendement matériel » (c'est-à-dire le rapport entre le poids du carbone bacillaire formé et le poids du carbone consommé) est beaucoup plus élevé avec la glycérine (0.47) qu'avec le glucose (0.28) et surtout qu'avec le lévulose (0,10). Il en est de même du « rendement énergétique » des processus de croissance (c'est-à-dire du rapport entre l'énergie emmagasinée dans la substance vivante et l'énergie métabolisable fournie par le milieu) ; avec la glycérine comme aliment ternaire, le rendement énergétique *brut* (le rendement réel n'ayant pu être déterminé) est voisin de celui trouvé pour d'autres êtres hétérotrophes (0,52). — La moitié environ du carbone fourni par la glycérine est employée à la formation de la substance vivante, l'autre moitié étant brûlée sous forme d'anhydride carbonique ; avec le glucose ce sont les $^2/_3$ du carbone consommé qui sont ainsi brûlés et avec le lévulose

90%. Cela explique la nécessité de fournir au bacille une assez grande quantité de glucose (40 gr. par litre de liquide nutritif) pour obtenir une culture normale, alors qu'une quantité deux fois moindre de carbone sous forme de glycérine lui suffit, toutes choses égales d'ailleurs, mais dans ce dernier cas le développement est aussi beaucoup plus lent.

e) La réaction optima du liquide nutritif ne saurait être absolue, mais dépend des aliments donnés : ainsi avec l'asparagine comme aliment azoté, la culture se développe plus rapidement et plus abondamment si la réaction initiale du milieu est acide ; si elle est neutre ou alcaline, le bacille ne se développe normalement qu'après avoir rendu le milieu acide (cette acidification n'est pas le fait d'une action spontanée).

II. — **Actions exercées par le Bacille sur son milieu.** —

a) Dans les produits de dégradation de l'asparagine, de la glycérine et du glucose par le bacille tuberculeux, on peut mettre en évidence une aldéhyde et les acides formique, acétique, malique succinique, propionique et lactique. — Les deux groupements azotés de l'asparagine sont attaqués dès le début du développement ; l'hydrolyse de la fonction amide se poursuit rapidement jusqu'à complète transformation en sel ammoniacal ; mais le bacille préfère l'azote aminé dont la transformation se fait au fur et à mesure des besoins, l'ammoniaque étant consommé en même temps que libéré. Cette transformation du groupement aminé donnerait, en passant par l'acide α cétonique, les acides malique et succinique, ce dernier produisant l'acide propionique par décarboxylation. Les acides formique, acétique et lactique peuvent provenir du dédoublement de la glycérine et du glucose avec passage par le méthylglyoxal.

b) On constate en outre l'exsudation par le bacille d'amylase, d'arbutase, d'un ferment lipolytique (monobutyrinase en particulier), d'un ferment protéolytique agissant en milieu alcalin sur les produits de dédoublement des protéines (albumoses et peptones) et sur les paranucléoprotéides (caséine).

c) Dans le milieu nutritif défini, privé de toute substance de nature variable telle que les albuminoïdes, il est possible de caractériser la nature chimique des produits dérivés de l'action vitale du bacille (tuberculine) : ce sont des protéines (albumine, globuline et albumoses à l'exclusion des peptones).

III. — **Actions exercées par l'âge et le milieu sur la constitution du Bacille.** — *a*) Au cours de son développement le bacille tuberculeux accuse une diminution de la teneur en azote et et d'autre part une augmentation de la teneur en eau, pour aboutir dans les deux cas à un temps en plateau coïncidant avec la période où la culture a atteint son plein développement et ne s'accroît plus. Puis, en vieillissant, la culture s'immerge : les bacilles s'hydratent tandis qu'il y a autolyse et perte d'azote.

b) La teneur du bacille en matières grasses n'est nullement une constante cellulaire, mais une variable alimentaire. Très élevée et de beaucoup supérieure à celle présentée par les autres microbes pathogènes lorsque le bacille s'est développé sur les milieux usuels complexes ou sur les milieux définis qui tous contiennent de la glycérine, elle diminue de 60 p. 100 environ lorsqu'on substitue le glucose à la glycérine (à équivalence de carbone), mais la qualité n'accuse pas de différences appréciables ; l'indice d'iode est toutefois un peu plus faible quand l'aliment ternaire est le glucose, et la proportion d'acides gras libres est plus forte. L'insaponifiable, dont le taux est variable mais toujours très élevé, traité par une solution alcoolique de digitonine selon la méthode de Windaus donne dans les deux cas un complexe présentant avec netteté les réactions de la cholestérine ; ce corps n'existe d'ailleurs qu'en quantité minime (0 gr. 16 à 0 gr. 45 p. 100 gr. de bacilles secs) ; sa proportion relativement au taux des matières grasses totales est remarquablement fixe chez les bacilles de même origine. — La source d'azote demeurant la même en qualité et en quantité, la nature de l'aliment hydrocarboné qui provoque une diminution du taux des graisses chez le bacille détermine un accroissement parallèle de sa teneur en azote de telle sorte que les substances grasses et les substances pro-

téiques s'équilibrent et que leur total demeure sensiblement constant quel que soit l'aliment ternaire. — La composition chimique du bacille tuberculeux arrive ainsi à se rapprocher, quantitativement, de celle indiquée pour la plupart des microbes pathogènes.

c) D'ailleurs la teneur du bacille en azote varie également avec la quantité et la qualité de l'aliment azoté offert, les autres facteurs demeurant les mêmes.

IV. — **Actions exercées par le milieu sur les propriétés du Bacille.** — *a*) Pour rechercher si des variations parallèles atteignent les propriétés histo-chimiques du bacille tuberculeux, il importe de préciser tout d'abord les temps de coloration et les temps de résistance à l'action des acides et de l'alcool. Bien que l'acido et l'alcoolo-résistances, tout en étant les résultantes des divers composants du bacille et de son intégrité physique, soient dues surtout aux matières grasses et principalement aux acides gras libres et aux cires, on ne constate pas que les bacilles très appauvris en graisses par culture sur milieu au glucose aient ces propriétés affaiblies. Elles sont donc moins dues à la quantité qu'à la qualité des corps gras (matières cireuses insaponifiables dont le taux demeure toujours très élevé).

b) — La résistance particulière que le bacille présente ainsi aux agents chimiques s'étend à l'action destructive des rayons ultra-violets : cette action ne s'exerce en effet qu'après un temps d'irradiation relativement long, qu'il s'agisse de la vie ou simplement de la virulence du bacille, de ses propriétés histo-chimiques ou de l'activité toxique de ses produits vitaux (tuberculine). Ici encore aucune différence n'apparait entre les bacilles développés sur milieu glycériné et ceux cultivés sur milieu glucosé.

c) — Des modifications morphologiques du bacille tuberculeux dues à la composition même du milieu peuvent être également constatées, mais ces variations qui prouvent l'ex-

trême plasticité de la cellule ne demeurent pas acquises : ce sont des formes aberrantes dues à de vicieuses conditions d'existence et qui disparaissent avec elles.

d) — Les conditions chimiques dans lesquelles se fait la culture influent de même sur la virulence. Elles peuvent expliquer l'inégale réceptivité des milieux : le pouvoir pathogène du bacille, comme son développement, semble fonction de la constitution chimique du terrain.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I.

Agulhon : « Recherches sur la présence et le rôle du bore chez les végétaux ». *Thèse Doct. ès. sciences*, Paris 1910.

Arnaud et **Charrin :** *C. R. Ac. Sc.* 1891, CXII, p. 755 et 1157.

Baudran : *C. R. Ac. Sc.* 1909, CXLIX, p. 874; — 1910, CL, p. 1200.

Becquerel (P.): *C. R. Ac. Sc.* 1913, CLVI, p. 164.

Berthelot (A.) : *C. R. Ac. Sc.*, 1892, CXV, p. 569 ; — 1893, CXVI, p. 842 ; — 1911, CLIII, p. 306. — *C. R. Soc. Biologie*, 1910, LXVIII, p. 757 ; — 1912, LXXII, p. 595.

Benecke : *Bot. Centralbl.*, 1985, XXVIII, p. 195. — *Jahrb. f. wiss. Bot.* 1895, XXVIII, p. 487.

Bertrand (G.) : *C. R. Ac. Sc.*, 1902, CXXXIV, p. 1434, et CXXXV, p. 809 ; — 1903, CXXXVI, p. 1083, et CXXXVII, p. 265 ; — 1912, CLIV, p. 381 et 616 ; — 1913, CLVII, p. 149. — *Bull. Sc. pharmacolog.* 1906, XIII, p. 651 ; — 1911, XVIII, p. 193 ; — 1912, XIX, p. 193 et 321 ; — 1913, XX, p. 41. — *Bull. Soc. chimique*, 1911, IX, p. 361. — Etude biochimique de la Bactérie du Sorbose. *Thèse Doct. ès. sciences* Paris 1904.

Bertrand et **Javillier** : *C. R. Ac. Sc.*, 1911, CLI, p. 225 et 900 ; CLII, p. 225, 900 et 1337. — *Bull. Soc. chimique*, 1912, XI, p. 212, 347, 400 et 494. — *Bull. Sc. pharmacolog.*, 1911, XVIII, p. 65 et 321.

Bertrand et **Sazerac** : *C. R. Ac. Sc.*, 1913, CLVII, p. 149. — *Bull. Soc. chimique*, 1914, XV, p. 627.

Bezançon, Philibert et **Boudin** : *Bull. Soc. Etudes scientif. sur la Tuberculose*, 1913, N° 1, p. 1.

Bierry et **Portier** : *C. R. Soc. Biologie*, 1919, LXXXII, p. 113.

Borrel, de **Coulon, Boez, Guimaud** : *C. R. Soc. Biologie*, 1922, LXXXVI, p. 388.

Bouilhac : *Ann. Agron.*, 1898, XXIV, p. 561.

Bouveault : Etudes chimiques sur le Bacille de la tuberculose aviaire. *Thèse Méd.* Paris, 1892.

Calmette, Massol et **Breton** : *C. R. Soc. Biologie*, 1909, LXVII, p. 580.

Charpentier : *Ann. Inst. Pasteur*, 1915, XXIX, p. 443.

Coupin : *C. R. Ac. Sc.*, 1903, CXXXVI, p. 392 ; — 1913, CLVII, p. 1075.

Czapek : *Biochemie der Pflanzen*, 2° édit. 1913, Iéna.
Dehérain : *Traité Chimie agricole*, 1902, p. 647 et 661.
Delille, Mayer, Schaeffer et Terroine : *C. R. Ac. Sc.*, 1912, CLIV, p. 537. — *C. R. Soc. Biologie*, 1913, LXXIV, p. 272. — *Revue de la Tuberculose*, Fév. 1914.
Demoussy : *C. R. Ac. Sc.*, 1901, CXXXIII, p. 1174.
Desgrez : *Bull. Sc. pharmacolog.*, 1901, III, p. 345.
Donzé et **Lambling** : *C. R. Soc. Biologie*, 1903, LV, p. 986.
Farkas : *Arch. f. die ges. Physiol.*, 1903, XCVIII, p. 490.
Fränkel et **Voges** : *Hygien. Rundschau.*, 1894, IV. N° 17.
Frouin : *C. R. Soc. Biologie*, 1910, LXVIII, p. 801 et 915 ; — 1912, LXXII, p. 1034, et LXXIII, p. 640 ; — 1913, LXXIV, p. 1184 ; — 1920, LXXXIII, p. 756.
Gautier (A.) : L'Alimentation et les régimes, 1904, Masson. édit. Paris.
Gayon et **Dubourg** : *C. R. Ac. Sc.*, 1980, CX, p. 865.
Gessard : *Ann. Inst. Pasteur*, 1891, V, p. 65 ; — 1902, XVI, p. 313.
Grimbert : Fermentation anaérobie produite par le Bac. orthobutylicus ; ses variations sous certaines influences biologiques. *Thèse Doct. ès sciences* Paris, 1893. — *Archiv de parasitologie*, 1898, I, p. 191. — Diagnostic des Bactéries, *Thèse Méd.* Paris, 1903.
Henri (V.) : *C. R. Soc. Biologie*, 1912, LXXII, p. 1037.
Javillier : C. *R. Ac. Sc.*, 1907, CXLV, p. 121 ; — 1908, CXLVI, p. 365 ; — 1911, CLII, p. 1337, et CLIII, p. 1177 ; — 1912, CLIV, p. 383, et CLV. p. 190 et 1551 ; 1913, CLVI, p. 406 et CLVII p. 1113 ; —1914, CLVIII, p. 140 et 1216. — Recherches sur la présence et le rôle du zinc chez les végétaux. *Thèse Doct. ès. sciences.* Paris 1908.
Kühne : *Zeitsch. f. Biologie*, 1892, XXIX, p. 26 ; — 1893, XXX, p. 221.
Laborde (J.) : Recherches physiologiques sur une moisissure nouvelle, l'Eurotiopsis Gayoni. *Thèse Doct. ès. sciences* 1896.
Lepierre (Ch.) : *C. R. Ac. Sc.*, 1913, CLVI, p. 258, 409, 1179, 1489, et CLVII, p. 876 ; — 1914, CLVIII, p. 67.
Lévy, Franz Blumenthal et **Marxer** : *Centralbl. f. Bakt.* I Orig. 1908, XLVI, 18 fév.
Lowenstein et **Pick** : *Biochemisch. Zeitschrift*, 1911, XXXI, p. 142.
Lutz : Les microorganismes fixateurs d'azote. *Thèse Pharm.* Paris, 1904.
Martin (H.) : *Archives Méd. expérim.*, 1889, I, p. 77.
Massol et **Breton** : *C. R. Soc. Biologie*, 1911, LXXI, p. 34.
Mayer (A.) et **Schaeffer** : *C. R. Soc. Biologie*, 1919, LXXXII, p. 113.
Molisch : *Bot. Centralbl.*, 1894, LX, p. 167.
Molliard : Cours professé à la Sorbonne.
Nocard et **Roux** : *Ann. Inst. Pasteur*, 1887, I, p. 19.
Naegeli : *Bot. Mittheil.*, 1881, III, p. 458.
Ouchinsky : *Archiv. Méd. expérim.*, 1893, V, p. 293. — *Centralbl. f. Bakt.*, 1893, XVI, p. 316.
Péré : *Ann. Inst. Pasteur*, 1892, VI, p. 512.
Pichard : *C. R. Ac. Sc.*, 1884, XCVIII, p. 1289 ; — 1889, CIX, p. 445 ; — 1891, CXII, p. 1455.

Proskauer et **Beck** : *Zeitsch. f. Hyg. und Infektionskr.*, 1894, XVIII, p. 128.
Rappin : *C. R. Soc. Biologie*, 1902, LIV, p. 318.
Raulin : Etudes chimiques sur la végétation, *Ann. des Sc. naturelles, Bot.* 5° Série, XI, 1869.
Robert (Thérèse) : Recherches sur le rôle physiologique du calcium chez les végétaux, *Thèse Doct. ès. sciences* Paris 1915.
Rubner : *Archiv. f. Hygiene*, 1906, LVII, p. 183.
Sauton : *C. R. Ac. Sc.*, 1912, CLV, p. 860 ; — *C. R. Soc. Biologie*, 1913, LXXIV, p. 1268 ; — Congrès international de Chimie appliquée, 1912, XIX, p. 267.
Schloesing et **Laurent** : *Ann. Inst. Pasteur*, 1892, VI, p. 67.
Terroine et **Wurmser** : *C. R. Ac. Sc.*, 1921, CLXXIII, p. 482 ; — 1922, CLXXIV, p. 1435, et CLXXV, p. 228.
Tiffeneau et **Marie** : *C. R. Soc. Biologie*, 1909, LXVI, p. 206 ; — 1912, LXXII, p. 48.
Vaillant (L.) : *C. R. Soc. Biologie*, 1906, LVIII, p. 741.
Winogradsky : *Ann. Inst. Pasteur*, 1890, IV, passim. — *C. R. Ac. Sc.*, 1893, CXVI, p. 1385 ; — 1894, CXVIII, p. 253.

CHAPITRE II.

Achalme : *Ann. Inst. Padsteur*, 1901, XV ; 1902, XVI, p. 633 et 662.
Aubel et Colin : *C. R. Ac. Sc.*, 1915, CLXI, p. 507. — *Journ. Pharm. et Chimie*, 1916, XII, p. 28.
Auclair : Etude expérimentale sur les poisons du bacille tuberculeux humain. *Thèse Méd.* Paris 1897. — *Revue de la Tuberculose*, 1898, VI, p. 97. — *Archiv. de Méd. expérim.* 1899 et 1900, passim.
Auclair et **Paris** : *Bulletin de la Société d'études scientifiq. sur la tuberculose*, 2° Serie, avril 1911.
Baudran : *C. R. Ac. Sc.*, 1906, CXLII, p. 657.
Bertrand (G.) : Cours professé à l'Inst. Pasteur.
Blanchetière : *Ann. Inst. Pasteur*, 1917, XXXI, p. 291 ; — 1920, XXXIV, p. 392.
Borrel (A.) : *Bull. Inst. Pasteur*, 1904, II, p. 410, 506, 588.
Bourquelot : Les Ferments solubles, *Soc. d'édit. scientif.* Paris, 1896.
Bouveault : Etudes chimiques sur le Bacille de la tuberculose aviaire. *Thèse Med. Paris*, 1892.
Brachin (A.) : Recherches sur la lactase, *Thèse Pharm.* Paris, 1904.
Carrière : *C. R. Soc. Biologie*, 1901, LIII, p. 320.
Delille : Les poisons tuberculeux et leurs rapports avec l'anaphylaxie et l'immunité, *Collection Critzmann*, Masson, Paris.
Delille et **Huet** : *Journal de physiologie et de pathologie générales.* Nov. 1906.
Euler et **H. Meyer** : *Zeitschrift f. physiol. Chemie*, 1912, LXXIX, p. 274, et LXXX, p. 241.

Fermi : *Zeitsch. f. Hyg.*, 1894, XVIII, N° 1. — *Centralbl. f. Bakt.* Origin. 1905, XL, p. 187.
Fernbach : *C. R. Ac. Sc.*, 1910, CLI, p. 1004.
Goris : *Ann. Inst. Pasteur*, 1920, XXXIV, p. 497.
Grund : *The Journ. of. med. Research*, 1911, XXV, Déc.
Hammerschlag : *Centralbl. f. klin. med.*, 1891, p. 1.
Holderer : Filtration des diastases, *Thèse Doct. ès. Siences*, Paris, 1911.
Huet : Contribution à l'étude des poisons tuberculeux, *Thèse Méd.* Paris, 1905.
Huppe : *Mittheil. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, 1884, II, p. 309. Berlin
Koch : *Deutsche medic. Wochensch.*, 1890, N° 46, ; — 1891, N° 17, p. 1189 ; 1897, N° 14, p. 209.
Kühne : *Zeitschrift f. Biologie*, 1892, XXIX, p. 26 ; — 1893, XXX, p. 221.
Lazarus : *Ann. Inst. Pasteur*, 1910, XXIV, p. 577.
Lockemann : *Zeitsch. f. physiol. chem.*, 1911, LXXIII, p. 389.
Lowenstein et **Pick** : *Biochemische Zeitschr.*, 1911, XXXI, p. 142.
Malfitano : *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, XIV, p. 60. — *C. R. Ac. Sc.*, 1900, CXXXI, p. 295.
Martin : *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, XII.
Mestrezat : *C. R. Ac. Sc.*, 1906, CXLIII, p. 185.
Mezernitskü : *Vratschebnaia Gazeta*, 1910, N° 14 Nov.
Prudden et **Hodenpyl** : *New-York med. Journ.*, 1891, 6 et 20 Juin.
Rüppel : *Zeitsch. f. physiol. Chemie*, 1898, XXVI, p. 218.
Smith : *Journal of. med. Research.*, 1905, XIII, fasc. 4, mai ; — 1910, XXIII, fasc. 2. p. 185.
Soerensen : *C. R. Travaux du Lab. de Carlsberg.*, 1907, VII, 1e livraison.
Thomas (P.) : Les diastases, méthodes de recherches et procédés d'étude. *Bull. Inst. Pasteur*, 1909,VII, p. 41, 90 et 138.
Vaudremer : *Ann. Inst. Pasteur*, 1910, XXIV, p. 189.
Vignal : *Archiv. de physiologie*, 1887, X, p. 286.

CHAPITRE III.

Agulhon : *C. R. Ac. Sc.*, 1911, CLII, p. 398.
Agulhon et **Frouin** : *Bull. Soc. Chimie biologique*, 1919, I, p. 176.
Alilaire et **Fernbach** : *C. R. Ac. Sc.*, 1920, CLXXI, p. 375.
Auclair : Cf. Biolographie Chap. II.
Auclair et **Paris** : *Archiv. Méd. expérim.*, 1907, XIX, p. 129 ; — 1908, XX, p. 737. — *C. R. Ac. Sc.*, 1907, CXLIV, p. 278 ; — 1908, CXLVI, p. 301. — Cf. Bibllographie Chap. II.
Babès et **Cantacuzène** : *Ann. Inst. Pasteur*, 1905, XIX, p. 609.
Baudran : Cf. Bibliographie Chap. I et II.
Behring : *Berlin. med. Wochenschr.*, 1899, N° 25, p. 537. — *Rapport de la Conf. internat. de la Tuberculose*, Paris, oct. 1905.

Besredka : *Bull. Inst. Pasteur*, 1914, XII, p. 145 et 193.

Borrel : *Bull. Inst. Pasteur*, 1904, II, p. 410, 506, 588.

Bullach et **Mac Leod** : *Journ. of. Hyg.*, 1901, IV, p. 1. — *Bull. Inst. Pasteur*, 1904, II. p. 381.

Cramer : *Archiv f. Hyg.*, 1893, XVI, p. 151 ; — 1895, XXII, p. 167.

Deycke Pascha et **Reschad Bey** : *Deutsche med. Woch.*, 1907, XXXIII, p. 89. — *Munchener med. Woch.*, 1910, p. 633.

Dorset : *Centralbl. f. Bakt.*, I Abt., XXXI, p. 305.

Dorset et **Emery** : *Annual Report Bureau of animal Industry*, 1904. — *Centralbl. f. Bakt.* (I), 1906, XXXVII, p. 363.

Fontès : *Centralbl. f. Bakt.* (I), 1909, XLIX, p. 317.

Frouin : *C. R. Ac. Sc.*, 1920, CLXX, p. 1471. — *C. R. Soc. Biologie*, 1920, LXXXIII, p. 756 ; — 1921, LXXXIV, p. 606.

Giaxa et **Gioffreddi** : *Centralbl. f. Bakt.*, 1900, XXX, p. 670.

Goris : Cf. Bibliographie Chap. II.

Grimbert et **Laudat** : *Journ. de Pharm. et Chimie*, 1914, IX, p. 97 et 145.

Hammerschlag : *Sitzungsber. d. k. Akad. d. Wissensch.*, déc. 1888. — *Centralblatt f. klin. Med.*, 1891, XII, p. 9.

Iscovesco : Les lipoïdes, *Presse médicale*, 1908, 19 et 28 août. — *C. R. Soc. Biologie*, 1908, LXIV, p. 269 ; — 1911, LXXI, p. 701 ; — 1912 LXXII, p. 225, 257, 318.

Klebs : *Centralbl. f. Bakt.*, (I), 1896, XX, p. 499.

Kraus et Siebert : *Centralbl. f. Bakt.*, 1909, LI, p. 305.

Kresling : *Centralbl. f. Bakt.*, (1), 1901, XXX, p. 897.

Kumagawa et **Suto** : *Biochem. Zeitschrift*, 1908, VIII, p. 212.

Lemeland : *Bull. Soc. Chimie biologique*, 1921, III, p. 134 ; — 1922, IV, p. 300. — *C. R. Soc. Biologie*, 1922, LXXXVII, p. 500.

Levène : *Journ. of. med. Res.*, 1901, I, p. 135. — *Zeitsch. f. physiol. Chemie.* 1901, XXXII, p. 549 ; — 1908, LVI, p. 552.

Meyer (A.) : *Botanische Zeitung*, 1904, LXII, p. 113.

Nicolle et Alilaire : *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, XXIII, p. 547.

Panzer : *Zeitschrift f. physiolog. Chemie*, 1912, LXXVIII, p. 414.

Roux : *Ann. Inst. Pasteur*, 1887, I, p. 445.

Ruppel : *Zeitschrift f. physiolog. Chemie*, 1898, XXVI, p. 218.

Schweinitz (de) et **Dorset** : *Annual Report Bureau of animal Industry*, 1888. — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1895, XVII, p. 605 ; — 1898, XX, p. 618 ; — 1903, XXV, p. 354. — *Centralbl. f. Bakt.* (I), 1896, XIX, p. 707 ; — 1898, XXVIII, p. 993 ; — 1902, XXXII, p. 186.

Tamura : *Zeitsch. f. physiolog. Chemie*, 1913, LXXXVII, p. 85.

Terroine : Contribution à la connaissance de la physiologie des substances grasses et lipoïdiques, *Thèse Doct. ès. sciences*, Paris, 1919. — *Ann. des Sc. naturelles, Zoologie*, 10e Série, IV, 1919.

Terroine, **Wurmser** et **Montané** : *C. R. Ac. Sc.*, 1922, CLXXV, p. 228.

Weyl : *Deutsche medic. Wochensch.*, 1891, N° 7, p. 256.

CHAPITRE IV.

Alvarez : *Archiv. de physiol. norm. et pathol.*, 1885, N° 7 .
Arloing : *C. R. Ac. Sc.*, 1908, CXLVI, p. 100. — *Revue de la Tuberculose*, 1910, N° 4, p. 254.
Auclair et **Paris** : Cf. Bibliographie Chap. II et III.
Babès et **Cantacuzène** : *Ann. Inst. Pasteur*, 1905, XIX, p. 699.
Bang : *Mittheil. aus Finsens med. Lichtinstitut*, 1905, IX, p. 164.
Benians : *Journ. of. path. and bact.*, 1912, XVII, p. 199.
Bezançon et **Philibert** : *Bull. Soc. études scientif. sur la tuberculose*, 1907, p. 203, 214, 224.
Bienstock : *Fortschritte d. Med.*, 1886, p. 193.
Bordier : *Archiv. Electr. médic.* 1910, N° 285, p. 396. — *C. R. Ac. Sc.*, 1910, CL, p. 634, et 886.
Bulloch et **Mac Leod** : Cf. Bibliographie Chap. III.
Camus et Pagniez : *C. R. Soc. Biologie*, 1905, LVII, p. 703. — *La Presse médicale*, 1907, XV, p. 65.
Dorset et **Emery** : Cf. Bibliographie Chap. III.
Ehrlich : *Deutsche medic. Wochensch.*, 1882, N° 19. — Beitrag zur Theorie der Bacillen-Färbung, *Charité-Annalen*, 1886, II, p. 123.
Ferran : *C. R. Ac. Sc.*, 1898, CXXVI, p. 1555.
Fontès : *Centralbl. f. Bakt.* (1), 1909, XLIX, p. 317.
Frei et **Pokchischwky** : *Centralbl. f. Bakt.* (1), LX, p. 161.
Gasis : *Centralbl.* f. *Bakt.* (1), 1902, XXXII, p. 161 et 320 ; — 1909, L, p. 111.
Goris : Cf. Bibliographie Chap. III.
Gottstein : *Fortschritte d. Med.* 1886, p. 252.
Grimme : *Centralbl. f. Bakt.*, (1) 1902, XXXII, p. 161 et 320.
Hammerschlag : Cf. Bibliographie Chap. II et III.
Hauser : *C. R. Soc. Biologie*, 1898, XLV, p. 1003.
Helbing : *Deutsche med. Wochensch.*, 1900, p. 133.
Henri (V.) et **Cernovodeanu** : *C. R. Ac. Sc.*, 1909, CXLIX, p. 365 ; — 1910, CL, p. 52, 549 et 729 ; CLI, p. 724 ; — 1911, CLIII, p. 265 et 426. — *C. R. Soc. Biologie*, 1911, LXX, p. 7.
Jacobson : *C. R. Soc. Biologie*, 1906, LX, p. 24.
Klebs : Cf. Bibliographie Chap. III.
Koch : *Berlin. klin. Wochens.*, 1882, N° 15. — *Mitth. aus d. kaiserl. Gesundheit.*, 1884, II, Berlin.
Konrich : *Deutsche medic. Wochens.*, 1920, p. 1225.
Kühne : Cf. Bibliographie Chap. I.
Muller : *Centralbl. f. Bakt.*, 1901, XXIX, p. 791.
Nelsen : *Fortsch. der Med.*, 1885, p. 200.
Nicolle : *Bull. Inst. Pasteur*, 1903, I, p. 137.
Philibert : Les pseudobacilles acido-résistants, *Thèse Méd.* Paris, 1908.
Raybaud : *C. R. Ac. Sc.*, 1909, CXLIX, p. 634.
Ruppel : Cf. Bibliographie Chap. III.

Tamura : Cf. Bibliographie Chap. III.
Treskinskaja : *Centralbl. f. Bakt.*, 1910, XLVII, p. 681 (analyse).
Vallée : *C. R. Soc. Biologie*, 1906, LX, p. 1020.
Vaudremer : *C. R. Soc. Biologie*, 1921, LXXXIV, p. 259.
Weigert : *Centralbl. f. die med. Wissenschaft*, 1881, N° 49.
Ziehl : *Deutsche med. Wochens.*, 1882, p. 451 ; — 1883, p. 247. — *Centralbl. f. die med. Wissenschaft*, 1883, p. 600.

CHAPITRE V.

Babès : Rapport du Congrès pour l'étude de la tuberculose, Paris, 1888.
Baudran : *C. R. Ac. Sc.*, 1909, CXLIX, p. 874 ; — 1910, CL, p. 1200.
Bertrand (G.) : Etude biochimique de la Bactérie du Sorbose. *Thèse Doct. ès sciences.* 1904. Paris.
Bordet, seul ou en collaboration avec **Gengou** : *Ann. Inst. Pasteur*, 1892, p. 328 ; — 1895, p. 462 ; — 1896 - 1902, passim (spécialement 1901, p. 68, 232, 289.).
Calmette, **Massol** et **Breton** : C. *R. Soc. Biologie*, 1909, LXVII, p. 580.
Chamberland et **Roux** : C. *R. Ac. Sc.*, 1883, XCVI, p. 1080.
Cohn : *Beitrag zur Biolog. der Pflanzen*, 1882, p. 127 et 202.
Coppen Jones : *Centralbl. f. Bakt.*, 1895, XVII, p. 1.
Czaplewski : *Die Untersuchung des Auswurf. auf Tuberkelbacillen*, 1891, Iena.
Ehrlich : *Berliner klin. Wochensch.*, 1898 et 1901, passim (spécialement N^os^ 21 et 22). — Théorie exposée dans la *Revue générale des sciences pures et appliquées*, par Lorenzo Verney, N° du 15 juin 1902.
Frouin : *C. R. Soc. Biologie*, 1921, LXXXIV, p. 606.
Gessard : *Ann. Inst. Pasteur*, 1891, V, p. 65 ; — 1892, VI, p. 807 ; — 1901, XV, p. 319 ; — 1902, XVI, p. 313.
Guignard et **Charrin** : *C. R. Ac. Sc.*, 1887, CV, p, 1192.
Le Dantec : La bactéridie charbonneuse, 1897, *Encycl. Léauté*, Masson, Paris. — La science et la vie, 1912, Flammarion, Paris.
Metchnikoff : *Ann. Inst. Pasteur*, 1887, I, p. 321 ; — 1888, II. p. 505 ; — 1895, IX, p. 433. — *Bull. Inst. Pasteur*, 1909, VII, p. 545 et 593.
Naegeli : *Untersuchungen über niederen Pilze*, 1877, Munich.
Nocard et **Roux** : *Ann. Inst. Pasteur*, 1888, II, p. 24.
Pasteur, **Chamberland** et **Roux** : *C. R. Ac. Sc.*, 1881, XCII, p. 429 et 666.
Roux et **Yersin** : *Ann. Inst. Pasteur*, 1888, 1889, 1900, passim.
Sartory (A.) : *Archiv. Méd. et Pharm. militaires*, 1916, LXV, p. 604. — *C. R. Ac. Sc.*, 1918, CLXVI, p. 181.
Whise et **Gammon** : *Journ. of. med. Research*, 1912, XXVI, f. 2. p, 257.

TRAITÉS GÉNÉRAUX.

Achalme : Electrotonique et Biologie, 1913, Masson édit., Paris.
André : Chimie végétale, *Encyclopédie agricole*, Baillière édit., Paris.
Bouchard et **Roger** : Nouveau Traité de Pathologie générale, T. I, Masson édit., Paris.
Burnet (E.) : Microbes et Toxines, 1912, E. Flammarion édit., Paris.
Duclaux : Traité de Microbiologie, Masson édit., Paris.
Gautier (E.) : Les toxines microbiennes et animales, 1896, Soc. d'édit. scient., Paris.
Lambling : Précis de Biochimie, Masson édit., Paris.
Lefèvre (J.) : Chaleur animale et bioénergétique, 1911, Masson édit., Paris.
Macé : Traité de Bactériologie, Baillière édit., Paris.
Straus : La Tuberculose et son bacille, 1895, Rueff édit., Paris.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION V

CHAPITRE I.

Culture du bacille tuberculeux sur milieu chimiquement défini.

HISTORIQUE 1

RECHERCHES PERSONNELLES :

1. Composition du milieu 18

2. Influence de la réaction du milieu 20

3. Valeur nutritive comparative de divers composés azotés . . 27

4. Valeur nutritive comparative de divers hydrates de carbone . 33
   Alcools polyatomiques : Erythrite, Dulcite, Mannite, Sorbite 35
   Pentoses : Arabinose 36
   Hexoses : Glucose 36
   Lévulose 37
   Galactose 38
   Hexobioses : Saccharose, Lactose, Maltose 39
   Polysaccharides : Amidon, Inuline, Dextrine 39
   Sels organiques : Citrates de potassium et de sodium . . 40

5. Valeur alimentaire comparée de la glycérine, du glucose et du lévulose 41
   Rendement matériel 43
   Bilan énergétique 45
   Rendement énergétique 48

6. Influence de la quantité d'aliments 50

7. Influence de divers métaux (Cuivre, Fer, Manganèse) . . . 53

CHAPITRE II.

Transformation du milieu au cours du développement microbien. Produits sécrétés (diastases et toxines).

1. Changements de réaction 58

2. Dégradation de l'asparagine et des aliments ternaires . . . 61

3. Diastases 69

4. Toxines (tuberculine) 82

CHAPITRE III.

Constitution chimique du bacille tuberculeux. Ses variations.

Historique 93

Recherches Personnelles :

1. Variations des proportions d'eau et d'azote dans le bacille tuberculeux au cours de son développement . . . 113

2. Variations de la teneur du bacille tuberculeux en azote avec la nature et la concentration de l'aliment azoté . . . 117

3. Variations de la teneur du bacille tuberculeux en matières grasses et en matières albuminoïdes avec la nature de l'aliment ternaire 119

CHAPITRE IV.

Propriétés du bacille tuberculeux. Sa résistance à certains agents chimiques et physiques.

Pages

1. Coloration. Acido-résistance et alcoolo-résistance 142

2. Action de la soude, de l'acide sulfurique, de l'acide chromique 153

3. Causes de l'acido-résistance et de l'alcoolo-résistance . . . 155

4. Action des radiations ultra-violettes 160

CHAPITRE V.

Influence du milieu sur la morphologie et la virulence du bacille tuberculeux.

1. Influence sur la morphologie 172

2. Influence sur la virulence 174

CONCLUSIONS 180

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE 186

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

BOTANIQUE : — Les Constituants morphologiques du Cytoplasme végétal. Leur role.

GÉOLOGIE : — Genèse des Eaux thermo-minérales.

Vu et approuvé :
Strasbourg, le 19 Septembre 1922
Le Doyen de la Faculté des Sciences
P. MULLER

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 21 Septembre 1922
Le Recteur de l'Académie de Strasbourg
S. CHARLETY